

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANO SANTOS RAMOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *PDIA3* E *PDIA6* EM CARCINOMAS
PRIMÁRIOS DE MAMA.**

CURITIBA

2013.

FABIANO SANTOS RAMOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *PDIA3* E *PDIA6* EM CARCINOMAS
PRIMÁRIOS DE MAMA.**

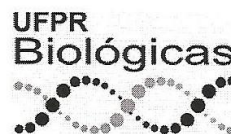
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profª Drª. Enilze M. S. Fonseca
Ribeiro

Co-orientador: Profº Dr. Iglénir João Cavalli



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FABIANO SANTOS RAMOS**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 22 de março de 2013

Doutor Marcos Euzébio Maciel
Instituto Federal do Paraná – Membro Titular

Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



Dedico esse trabalho aos meus pais, Wilson e Iraci, pela vida, ensinamentos e toda a dedicação. Aos meus queridos orientadores pela oportunidade de crescer como pessoa e como pesquisador.

Muito Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa. E como a vida vai passando, algumas pessoas vão saindo das nossas vidas, outras entrando. O importante nunca será com quantas pessoas se pode contar e sim, se você realmente poderá contar com aquelas que você escolheu pra sua vida. Gostaria de começar meus agradecimentos aos meus pais, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigado por toda a dedicação, esforço, dias e dias de trabalho pra conseguir que hoje eu me tornasse algo muito maior do que eu mesmo jamais poderia ter sonhado, principalmente pelo lugar de onde vim. Gostaria de agradecer também aos meus queridos orientadores, professora Enilze e professor Iglénir. Eles são os reais responsáveis pelo meu crescimento científico. Muito obrigado por sempre se mostrarem tão prestativos e atenciosos, e principalmente por corrigir meus erros. Não poderia estar em melhores mãos.

Não poderia também esquecer dos meus colegas de laboratório, os quais fizeram deste período conturbado, um lugar melhor. Gostaria de fazer um adendo para quatro colegas muito especiais. Cíntia, cintilante, que com toda sua nobreza tanto me ajudou com suas significativas opiniões, e tanto fez piadinhas sobre mim. Leandro, o melhor IC da história, o qual por mérito sabe muito mais do que doutorandos e mestrandos. Sempre prestativo e paciente. Bruna, brunex, por ter competentemente organizado nossas tabelas de dados, estragando minhas dietas com seus doces, e por sempre trazer alegria ao nosso laboratório. O Gustavo, o mister simpatia, que se mostrou um grande amigo, um grande perdedor de poker, e um perna de pau no futebol. Além desses novos companheiros, trago sempre comigo a força dos meus velhos e bons amigos. Ana Carolina, que nunca deixou nossa amizade enfraquecer, e sempre ouviu minhas reclamações. Maria Rosa que sempre faz piadas sobre o meu dedo, e não sei por que adora tanto o nosso *freezer* -80°C. Ao cara mais ausente do mundo, senhor Marcos, mas que pra sempre será o cara que eu ligarei quando sentir que o mundo esta desabando. E ele sempre me dirá: Cara, relaxa!

Além de agradecer a Deus, pelo direito a vida e principalmente por colocar a melhor pessoa que poderia estar na minha vida. Fernanda, você é a razão por eu lutar todos os meus dias. Você é aquela que eu quero que faça parte de toda a minha vida. Obrigado por me mostrar que como a vida pode ser melhor. Por acreditar que eu posso realizar todos os meus sonhos. Obrigado por me fazer um homem melhor.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou

Construir um castelo...

Nemo Nox

RESUMO

O câncer é uma doença genética, de caráter multifatorial, resultantes de alterações genômicas como mutações pontuais, rearranjos, deleções e ampliações que determinam modificações na expressão dos oncogenes e de genes supressores de tumor. A incidência e mortalidade por câncer vem aumentando a cada ano no mundo, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública. O câncer de mama é a segunda neoplasia mais comum e a principal causa de morte em mulheres em todo o mundo. A análise de expressão gênica, através de PCR em tempo real, de *PDIA3* e *PDIA6* foi realizada em pacientes que apresentavam câncer de mama primário. Estes genes codificam proteínas que estão envolvidas no controle do estresse celular e são abundantes no retículo endoplasmático. Além disso, quando alteradas, podem estar relacionadas a várias etapas do processo carcinogênico. O presente trabalho analisou a expressão destes genes comparado-a entre o tecido mamário tumoral e não tumoral, e no primeiro entre diferentes parâmetros clínicos, como presença ou ausência de metástase nos linfonodos, receptores hormonais, estrogênio e progesterona, positivos e negativos (ER+/PR+;ER-/PR-), e grau histológico do tumor. Foi observada diferença estatisticamente significativa ($U=57,50$, $p= 0,0009$) na expressão do gene *PDIA3* entre o tecido tumoral e não tumoral, sendo maior no primeiro, na presença e ausência de metástase nos linfonodos ($t= 2.185$, $p= 0.0099$) e entre diferentes graus histológicos ($U= 68.00$, $p= 0.0244$). Para o gene *PDIA6*, a significância da diferença entre as médias de expressão foi verificada entre a presença e ausência de metástase ($U= 99.00$, $p = 0.0476$) e ER+/PR+//ER-/PR- ($U= 61.50$, $p= 0.0351$). Estes resultados sugerem que o gene *PDIA3* influencia nos processos iniciais e de progressão do câncer de mama, e o gene *PDIA6* está principalmente envolvido na progressão.

Palavras-chaves: Câncer de mama, expressão gênica, proteína dissulfeto isomerase.

ABSTRACT

Cancer is a genetic multifactorial disease, resulting from genomic alterations such as point mutations, rearrangements, deletions and amplifications that determine changes in the expression of oncogenes and tumor suppressor genes. The incidence and mortality from cancer are increasing every year worldwide, making it one of the biggest public health issues. Breast cancer is the second most frequent type of cancer and the major cause of cancer death in women worldwide. The gene expression analysis by real-time PCR of *PDIA3* and *PDIA6* was performed in patients with primary breast cancer. These genes encode proteins that are involved in the control of cellular stress and are abundant in the endoplasmic reticulum. Furthermore, when altered, they may be related to various stages of the carcinogenic process. The present study examined the expression of these genes comparing it between tumor and non-tumor breast tissue, and the first between different clinical parameters, such as presence or absence of lymph node metastasis, hormone receptors status, estrogen and progesterone positive and negative (ER+/PR+;ER-/PR-), and histologic grade of the tumor. It was found significant difference in *PDIA3* gene expression (U=57,50, p= 0,0009) between tumor and non-tumor tissue, expression being higher in the first, in the presence and absence of metastases in the lymph nodes ($t= 2.185$, p= 0.0099) and between different histological grades (U= 68.00, p= 0.0244). For *PDIA6* gene, the significance of the difference between the mean expression was observed between the presence and absence of metastasis (U= 99.00, p = 0.0476) and ER+/PR+ /ER-/PR- (U= 61.50, p= 0.0351). These results suggest that the gene *PDIA3* influences the initial processes and progression of breast cancer and the gene *PDIA6* is mainly involved in the progression of the disease.

Keywords: Breast cancer, gene expression, protein disulfide isomerase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CLASSES DOS GENES PARTICIPANTES NO PROCESSO METASTÁTICO.....	14
FIGURA 2 - INCIDÊNCIA ESTIMADA DE CÂNCER DE MAMA NO BRASIL PARA O ANO DE 2012, A CADA 100.000 MULHERES.....	18
FIGURA 3 - TAXA DE MORTALIDADE DE CÂNCER DE MAMA FEMININO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1995 E 2007, POR 100 MIL MULHERES.....	19
FIGURA 4 - ANATOMIA DA MAMA.....	20
FIGURA 5 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DA CISTINA NA FORMAÇÃO E QUEBRA DE PONTES DISSULFETO NA MOLÉCULA DE PROTEÍNA.....	35
FIGURA 6 – ANÁLISE DE ESTABILIDADE DOS CANDIDATOS A GENES DE REFERÊNCIA.....	94
FIGURA 7 - VERIFICAÇÃO DO GRADIENTE DO GENE <i>PDIA3</i>	99
FIGURA 8 - VERIFICAÇÃO DO GRADIENTE DO GENE <i>PDIA6</i>	100
FIGURA 9 - OBTENÇÃO DOS DADOS BRUTOS DA FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO EQUIPAMENTO <i>REAL PLEX (EPPENDORF)</i>	101
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DAS REPLICATAS EM ESCALA LOGARÍTMICA.....	102
FIGURA 11 - FASES DA CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL.....	106

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	89
QUADRO 2 – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RETROTRANSCRIÇÃO PARA TRÊS REAÇÕES.....	91
QUADRO 3 - CANDIDATOS A GENES DE REFERÊNCIA INCLUÍDOS NO CARTÃO <i>TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL</i>	93
QUADRO 4 - SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES <i>FOWARD</i> E <i>REVERSE</i> PARA OS GENES DE REFERÊNCIA SELECIONADOS.	95
QUADRO 5 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES <i>FORWARD</i> E <i>REVERSE</i> PARA OS GENES ALVOS.....	97
QUADRO 6 - PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RTq-PCR.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SAMPLE CHARACTERIZATION	55
TABELA 2 – SEQUENCE OF PRIMERS	57
TABELA 3 – <i>PDIA3</i> AND <i>PDIA6</i> RELATIVE EXPRESSIONS.....	61
TABELA 4 - EXEMPLO DE CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DO DESVIO PADRÃO DAS CURVAS DE REAÇÃO.....	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 BREVE VISÃO GERAL DO CÂNCER	12
1.2 ESTATÍSTICA DO CÂNCER DE MAMA	17
1.3 A ANATOMIA DA MAMA	20
1.4 O CÂNCER DE MAMA E SEUS FATORES DE RISCO	21
1.5 DETECÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA	26
1.6 ESTADIAMENTO DO CÂNCER	28
1.7 GENES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA	31
1.8 A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA	33
1.9 PROTEÍNAS DISSULFETO ISOMERASE	35
1.10 OS GENES <i>PDIA3</i> E <i>PDIA6</i> E SEUS PRODUTOS PROTEÍCOS	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
4. CAPÍTULO I	44
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE I	87
MATERIAL E MÉTODOS	87
CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	87
EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E RETROTRANSCRIÇÃO.....	90
SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA	92
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES EM ESTUDO.....	97
PADRONIZAÇÃO DE REAÇÃO	99
1.1.1 Verificação do gradiente de temperatura	99
Determinação das eficiências de reação	101
Reações de RTq-PCR	103
Análise estatística	104
APÊNDICE II	105
ANEXO I	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 BREVE VISÃO GERAL DO CÂNCER

O câncer é uma doença evidentemente genética, de caráter multifatorial, que é desencadeada por alterações genômicas, tais como mutações pontuais, rearranjos, deleções e amplificações (STORCHOVA e PELLMAN, 2004) que resultam nas modificações de expressão dos oncogenes e genes supressores de tumor (NICHOLSON e ANDERSON, 2002). A incidência e mortalidade por câncer vem aumentando a cada ano no mundo, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública. Câncer é o termo que designa várias doenças que apresentam em comum o descontrole do ciclo celular levando ao crescimento desordenado das células e capacidade de invasão de tecidos adjacentes ou à distância (metástases). Esse grande número de células em locais específicos é chamado de tumor, sendo a tumorigênese um processo que envolve múltiplos passos. Cada um desses passos produz como consequência uma alteração genética, levando à transformação progressiva de uma célula normal em uma neoplásica. Essas alterações genéticas podem conferir vantagens a estas células e facilitar o crescimento celular, o que finalmente conduzem a formação de tumores e, eventualmente, o estabelecimento de metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Tem-se sugerido seis alterações na fisiologia das células para a transformação clonal: autossuficiência na produção de fatores de crescimento, perda de resposta a sinais inibitórios ao crescimento celular, resistência à apoptose, aquisição de potencial replicativo ilimitado, promoção de angiogênese e invasão dos tecidos. Há defeitos genéticos que levam à manifestação desses fenótipos que envolvem a perda das funções de genes supressores de tumor e/ou ativação de oncogenes que promovem o crescimento tumoral. Exemplos bem conhecidos para tais eventos são mutações pontuais dos genes da família *RAS*, deleção no gene do controle do ciclo celular, *CDKN2A (p16)*, e a translocação recíproca balanceada *t(9;22)* criando o gene de fusão *BCR-ABL*.

Essas alterações nos genes se somam a outros fatores que são observados nos processos neoplásicos, tais como: instabilidade genética (permite a geração de mutações aleatórias), processos inflamatórios em regiões malignas ou pré-malignas

(provocado por células do sistema imune que em muitas ocasiões favorecem a progressão tumoral), reprogramação do metabolismo celular, evasão da resposta imune contra o tumor (HANAHAN e WEIBERG, 2011).

Entre 5 e 10% das neoplasias são resultados diretos da herança de genes relacionados ao câncer, mas grande parte envolve danos ao material genético, de origem física, química ou biológica, que se acumulam ao longo da vida (ADAMI *et al.*, 2001; WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2008).

O processo metastático continua sendo um dos menos compreendidos na biologia do câncer, apesar de ser extensivamente estudado. O surgimento de metástases disseminadas continua sendo a principal causa de morte em pacientes com câncer (FIDLER, 2003; GUPTA e MASSAGUÉ, 2006). A metástase está presente em cerca de 90% das mortes de pacientes com tumores sólidos e apresenta um conjunto extremamente diversificado de manifestações clínicas. No câncer de mama, a metástase pode ser indetectável, permanecendo latente por muitos anos após a remoção do tumor primário, e emergindo como lesões incuráveis que são acionadas por causas desconhecidas. Em contraste, o câncer pancreático e de pulmão, muitas vezes apresentam metástases generalizadas já no momento do diagnóstico inicial (MASSAGUÉ, 2007). Os riscos de recidivas metastáticas podem, por vezes, ser previstas a partir de certas características do tumor primário, como no caso dos cânceres de mama, para os quais o tamanho do tumor, grau histológico, e do padrão de expressão gênica são indicativos do risco de recaída (WEIGELT, PETERSE e VAN'T VEER, 2005). Tem sido proposto que a expressão de genes específicos em tumores primários possa predispor células cancerosas a crescerem em órgãos distantes (KARNOUB e WEINBERG, 2007). Por exemplo, em modelos de câncer de pulmão, certos genes quando expressos em células de câncer de mama levam ao desenvolvimento de metástases pulmonares (DUPONT *et al.*, 2007).

Estudos genéticos visando à compreensão da capacidade de invasão de células de tumores mamários levaram à identificação de um grupo de genes cuja expressão está associada com o alto risco de metástases e pior sobrevida dos pacientes (PEROU *et al.*, 2000; MASSAGUÉ, 2007). Foram designados como genes de “iniciação de metástase”, aqueles que conferem uma vantagem aos tumores primários, facilitando a entrada das células tumorais na corrente sanguínea. Outro grupo de genes pode contribuir para funções adicionais que os torna vantajosos no

local da metástase, mas não no tumor primário. Estes são os chamados “genes de progressão da metástase” e irão conferir uma vantagem restrita a um determinado órgão alvo, promovendo a invasão tecido-específica. E por fim, os “genes de virulência da metástase”, os quais fornecem uma vantagem seletiva em sítios secundários, mas não no tumor primário, assim participando na colonização metastática, porém sem auxiliar no desenvolvimento do tumor primário (NGUYEN e MASSAGUÉ, 2007) (FIGURA 1).

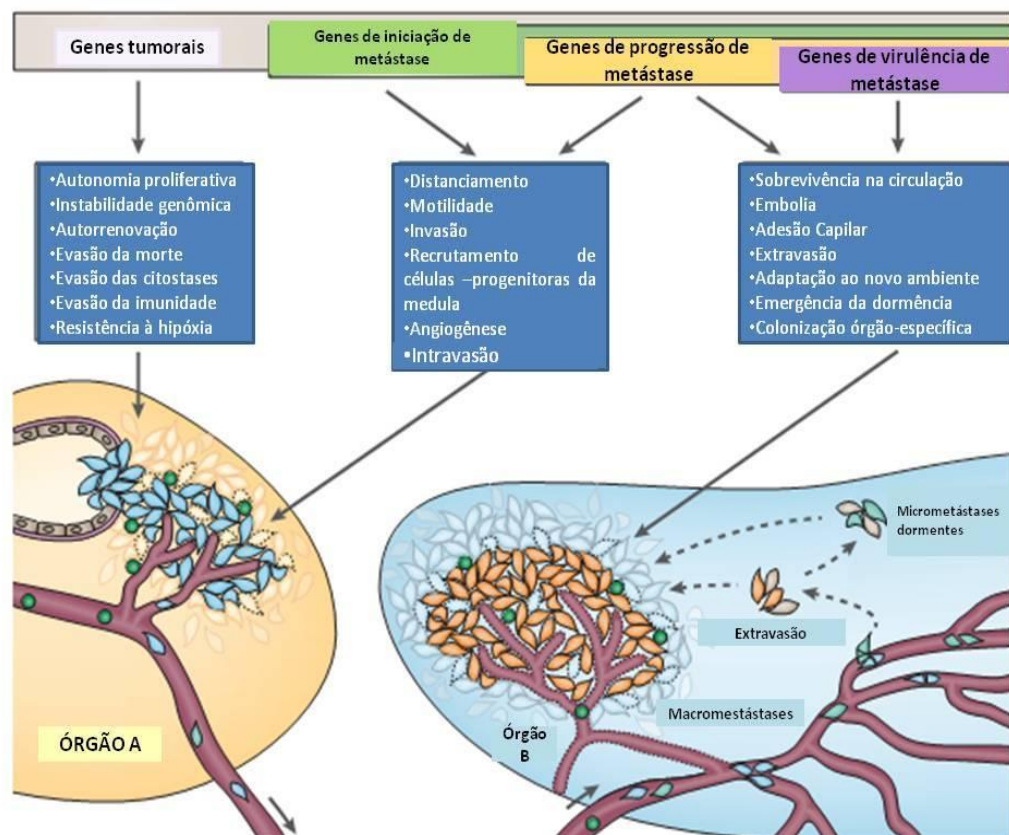


FIGURA 1 – CLASSES DOS GENES PARTICIPANTES NO PROCESSO METASTÁTICO. Com base nos seus níveis de participação no processo metastático os genes foram agrupados em três categorias, genes de iniciação, de progressão e de virulência da metástase. FONTE: Adaptado de NGUYEN e MASSAGUÉ 2007.

Os processos metastáticos ocorrem em várias etapas que requerem a ação coordenada de vários genes: a fuga de células cancerosas do tumor primário e entrada na corrente sanguínea (intravasamento), sobrevivência na circulação, a saída dos capilares para os tecidos ao redor de um novo sítio (extravasamento), iniciação de crescimento para formar micrometástases, e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para formar tumores secundários (CHAMBERS *et al.*, 2000; GUPTA e MASSAGUÉ, 2006).

O câncer de mama se dissemina, primeiramente, através do sistema linfático, sendo os linfonodos mais próximos à mama geralmente os primeiros locais envolvidos no processo metastático, seguidos por metástases no pulmão, fígado, ossos e cérebro, sendo que neste em torno de 20 a 30% dos tumores são derivados de células metastáticas do câncer de mama (PATHEL e MEHTA, 2007). É também a segunda causa mais comum de metástases no sistema nervoso central, e o tumor sólido mais comumente associado às metástases leptomeníngicas (LEE, 2003). Doenças neurológicas foram a causa da morte ou tiveram grande contribuição em cerca de 50% dos pacientes com câncer de mama que apresentavam metástase no cérebro (BOOGERD *et al.*, 2003). Entre as mulheres com câncer de mama, 30 a 40% desenvolvem a doença metastática. Por mais que as células metastáticas consigam migrar para uma grande quantidade de tecidos, a sua capacidade de sobrevivência é limitada, e elas encontram nestes tecidos específicos um microambiente desfavorável para sua sobrevivência (KARNOUB e WEINBERG, 2007).

Além de eventos genéticos, vários estudos apontam que alterações epigenéticas desempenham papel essencial na gênese de uma gama de cânceres, por alterar a expressão de genes críticos, podendo resultar na expressão aumentada de oncogenes e/ou na inativação de genes supressores tumorais (SHINOZAKI *et al.*, 2005; RODENHISER e MANN, 2006). O termo epigenética refere-se a alterações na expressão gênica mediada por mecanismos diferentes daqueles que alteram as sequências de nucleotídeos de um DNA. Os mecanismos epigenéticos mais claros, até o momento, são as alterações no padrão de metilação do DNA e as modificações covalentes de proteínas histonas. A hipometilação global tem o potencial de contribuir para um fenótipo maligno, afetando a estabilidade funcional dos cromossomos, a reativação de elementos transponíveis, e perda de padrões normais de *imprinting* de genes (EHRLICH, 2002). Em contrapartida, quase todos os tipos de cânceres observados apresentam ganhos de metilação nos promotores associados a ilhas CpG que demonstram relação com a inativação transcricional e representam um importante mecanismo de silenciamento de genes na patogênese das neoplasias (BAYLIN e HERMAN, 2000; EGGER *et al.*, 2004). Este fenômeno é tão comum como a ocorrência de mutações como mecanismo de inativação de genes supressores de tumor (JONES e BAYLIN, 2002). Assim como proposto por Knudson na hipótese dos dois eventos, a perturbação da função de um gene

supressor de tumor requer, geralmente, uma perda completa da função de ambas as cópias do gene (KNUDSON, 1971). Neste contexto, a hipermetilação do promotor pode exercer os mesmos efeitos de uma mutação ou deleção da região codificadora de uma cópia do gene e pode, assim, ser considerada como uma via adicional que contribui para a perda de um ou de ambos os alelos (HERMAN e BAYLIN, 2003). O primeiro caso observado de hipermetilação foi no gene que codifica a proteína do retinoblastoma (*RB*) (GREGER *et al.*, 1989), o qual se comporta como um supressor de tumor. Os outros exemplos são os supressores de tumores *MHL* (*Mult homolog 1*) no câncer de cólon (KANE *et al.*, 1997; HERMAN *et al.*, 1998), *CDKN2A* (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2a*) ou *p16* no câncer de pulmão (GONZALEZ-ZULUETA *et al.*, 1995; HERMAN *et al.*, 1995), *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) em câncer de mama (DOBROVIC e SIMPFENDORFER, 1997) e *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) em glioblastomas (ESTELLER *et al.*, 1999).

As perturbações na estrutura da cromatina, metilação do DNA e *imprinting* genômico podem ser consideradas como alternativas às mutações gênicas, contribuindo eventualmente, para a progressão do tumor clonal. Tem-se demonstrado que células tumorais podem conter alterações na estrutura da cromatina, as quais levam a alterações na expressão gênica (JONES e BAYLIN, 2007). Por outro lado, tem sido postulado que os moduladores epigenéticos de plasticidade celular podem iniciar o fenótipo maligno, conferindo um estado de células progenitoras (FEINBERG, OHLSSON e HEINKOFF, 2006). Se a capacidade de disseminação metastática é adquirida no início, em seguida, os genes que regulam epigeneticamente células progenitoras também podem ser “marcados” metastaticamente. Um exemplo é proporcionado pelo componente de *EZH2* dos complexos *Polycomb*, que catalisam modificações de histonas e promovem a metilação de DNA em células-tronco de mamíferos (BAYLIN e OHM, 2006): a superexpressão de *EZH2* é preditiva de crescimento invasivo em cânceres de próstata e mama metastáticos (KLEER *et al.*, 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o primeiro no sexo feminino correspondendo, anualmente, a 22% dos casos novos de câncer em mulheres (JEMAL *et al.*, 2010). Esta neoplasia é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo mundo. No Brasil, é a neoplasia mais frequente no sexo feminino e vem sendo verificado aumento nos coeficientes de mortalidade padronizados nos últimos 30 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). O número de casos diagnosticados com câncer de mama no mundo tem aumentado 3,1% anualmente durante os últimos trinta anos. Uma estimativa de 1,6 milhões de casos foi esperada para o ano de 2012 comparada com aproximadamente 640 mil casos, em 1980 (WORLD BREAST CANCER REPORT, 2013).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de novos casos de carcinomas mamários estimados para o ano de 2012 foi de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (FIGURA 2). Para a região Sul do Brasil, este índice aumenta para 62 casos a cada 100 mil mulheres. Provavelmente, não ocorre um número maior de casos na região no sul do país, e sim uma melhor detecção e registro mais eficientes perante as outras regiões (INCA 2012). Em 2011, havia 1,5 milhões de pessoas diagnosticadas com câncer de mama no mundo (RELATÓRIO MUNDIAL PARA O CÂNCER DE MAMA, 2012). De acordo com a OMS, o câncer provoca 450 mil mortes anualmente em todo o mundo.

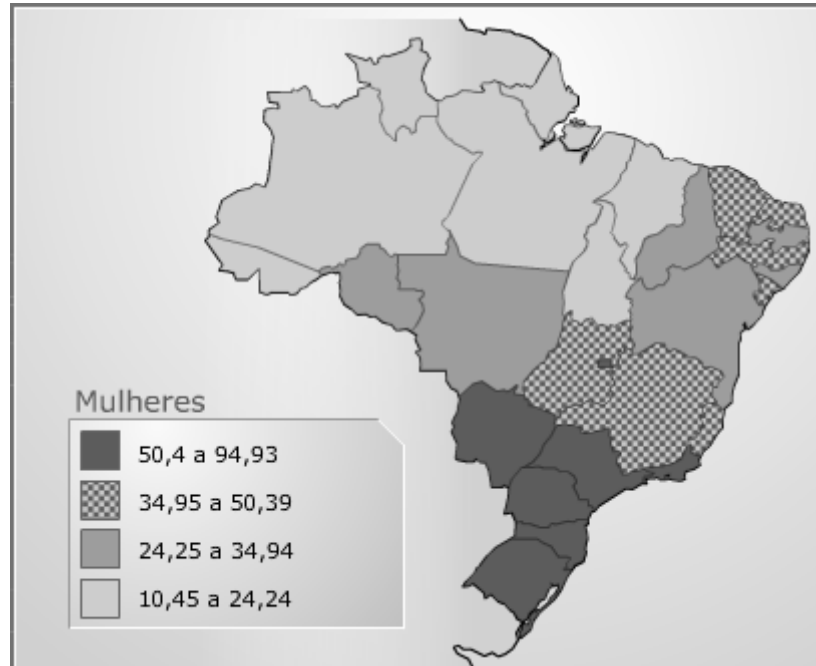


FIGURA 2: INCIDÊNCIA ESTIMADA DE CÂNCER DE MAMA NO BRASIL PARA O ANO DE 2012, A CADA 100.000 MULHERES.

FONTE: INCA, 2012.

Estima-se que a sobrevivência geral média cumulativa, após cinco anos, seja de 85% nos países desenvolvidos e de 60% nos em desenvolvimento. Na população mundial, a sobrevivência média, após cinco anos, é de 61%, sendo que os Estados Unidos apresentam uma sobrevivência de 85% para este mesmo período. Já no Brasil, as taxas de mortalidade continuam elevadas (INCA, 2012). Nos países desenvolvidos, a estratégia utilizada para a diminuição da mortalidade é o rastreamento, com o objetivo de detectar precocemente o câncer clinicamente oculto, portanto, em estágios iniciais. O Ministério da Saúde do Brasil criou sucessivas campanhas de esclarecimento à população enfatizando os meios disponíveis para prevenção: autoexame, exame clínico por profissionais da saúde e a mamografia (GODINHO e KOCH, 2004; INCA, 2012). O INCA não estimula o autoexame das mamas como método isolado de detecção precoce do câncer de mama (INCA, 2012).

A maioria dos novos casos de câncer de mama ocorre em mulheres de baixa e média renda familiar, nos quais a incidência está aumentando em até 5% ao ano (IARC, 2002; STEWART, *et al.*, 2003). Sua incidência e a taxa de mortalidade estão intimamente relacionadas ao avanço da idade, embora seja também uma neoplasia relativamente frequente em mulheres mais jovens (FIGURA 3).

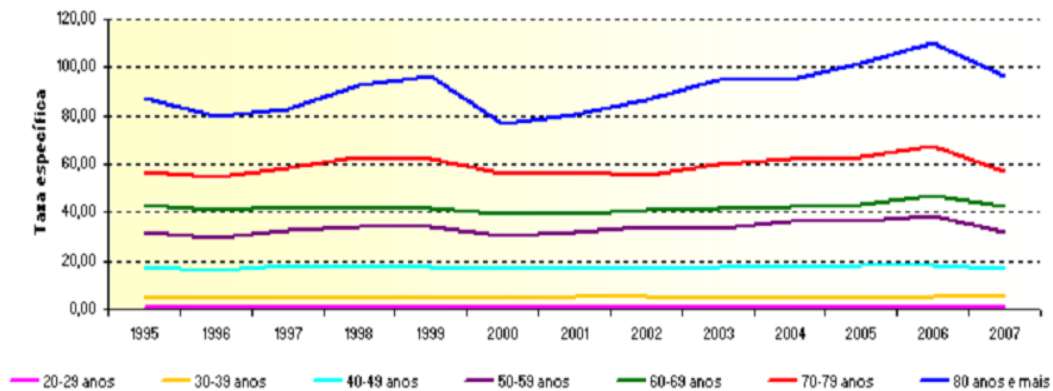


FIGURA 3: TAXA DE MORTALIDADE DE CÂNCER DE MAMA FEMININO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1995 E 2007, POR 100 MIL MULHERES.

FONTE: INCA, 2012.

Estudos como o de Jemal *et al.* (2010) observaram que desde 1990 vem ocorrendo um aumento na incidência do câncer de mama feminino em muitos países. Segundo dados do DataSUS do Ministério da Saúde, o número de mulheres que morreram por causa do câncer de mama aumentou 45% nos últimos 10 anos. Isto vem sendo associado às mudanças socioeconômicas e demográficas ou ainda, ao aumento dos registros decorrente da maior acessibilidade aos serviços de saúde, e com a melhoria da qualidade de vida, conseqüentemente, maior é a sobrevivência e maior a incidência do câncer (KLIGERMAN, 1999). Para Tavares e Trad (2010), o aumento dos índices de câncer de mama e da mortalidade se deve, também, à melhoria da precisão diagnóstica e da qualidade do preenchimento das declarações de óbitos. Contudo, mantêm-se como causas principais o diagnóstico e tratamento tardios. Além disso, há impossibilidade de prevenção primária total, pois a etiologia envolve fatores de risco associados à vida reprodutiva da mulher e características genéticas (INCA, 2012).

1.3 A ANATOMIA DA MAMA

A glândula mamária (FIGURA 4) é formada por um epitélio ducto-lobular ramificado (TOILLON *et al.*, 2007). O epitélio secretor, parênquima, é constituído de 15 a 20 lobos mamários, e cada lobo formado por um número variável de pequenos lóbulos (BIRNBAUM *et al.*, 2004). Os lóbulos organizam-se como uma rede de ductos e de pequenos alvéolos, os quais são revestidos por uma camada interna de células epiteliais luminais. Estas últimas são glandulares, polarizadas (TOILLON *et al.*, 2007) também responsáveis pela síntese e passagem de leite (NANDI, 1995). Ao redor das células epiteliais luminais estão as mioepiteliais que contribuem significativamente para a formação da membrana basal e a sua diferenciação miogênica é responsável pela função contrátil que permite a ejeção do leite (TOILLON *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, o conhecimento da organização da estrutura mamária, formada por células epiteliais luminais e mioepiteliais, foi de extrema relevância para o entendimento e classificação das patologias do tecido mamário.

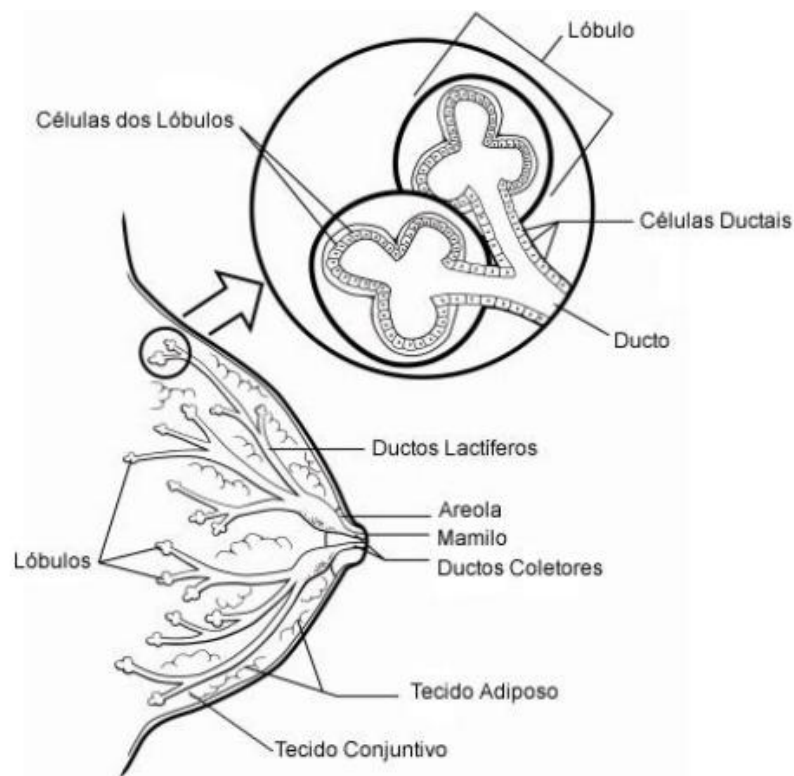


FIGURA 4 – ANATOMIA DA MAMA.
 FONTE: Adaptado de AMERICAN BREAST CANCER, 2010.

1.4 O CÂNCER DE MAMA E SEUS FATORES DE RISCO

O câncer de mama ocorre quando as células deste órgão passam a se dividir muito rápido e de forma desordenada. A grande maioria (cerca de 80%) dos cânceres de mama acomete as células dos ductos da mama, sendo, portanto, o carcinoma ductal o mais comum dos tipos de câncer de mama. Este pode ser *in situ*, quando não passa das primeiras camadas de células destes ductos, ou invasor, quando invade os tecidos em volta. Os cânceres que começam nos lóbulos da mama são chamados de carcinomas lobulares, sendo menos comuns do que os ductais. Este tipo de câncer, muito frequentemente, acomete as duas mamas. O carcinoma inflamatório de mama é um câncer mais raro e, normalmente, se apresenta de forma mais agressiva, comprometendo toda a mama, que apresenta sinais inflamatórios tais como edema, calor e rubor (HORNBERG, 2006). Para câncer de mama, entre 90 a 95% dos casos são esporádicos, decorrentes de mutações somáticas que ocorrem durante a vida, enquanto entre 5 a 10% são hereditários, devido à herança de um alelo contendo uma mutação germinativa, que confere a essas mulheres uma suscetibilidade aumentada (INCA, 2004).

Fatores ambientais, hábitos alimentares, exposição à carcinógenos e fatores intrínsecos ao genoma de cada indivíduo (predisposição) estão inter-relacionados ao surgimento de neoplasias. Ser portador de um fator de risco, ou mesmo vários, não é a principal causa da doença, e podem se passar muitos anos entre a exposição externa a um carcinógeno e a detecção do câncer. Há evidências que o câncer possa ser prevenido, e isso é baseado em estudos internacionais onde foram observadas variações nas taxas de incidência de câncer segundo as variáveis tempo e lugar. Por exemplo, populações que migram de um lugar para o outro, onde ocorrem variações nos índices de incidência de câncer tendem a ter suas taxas também alteradas, o que demonstra que as neoplasias são, em parte, influenciadas pelas condições ambientais, não sendo determinadas apenas por fatores genéticos (GRAHAM, 2005). Segundo o INCA (2009), pelo menos um terço dos casos de novos cânceres que ocorrem no mundo anualmente poderia ser prevenido.

A maioria das mulheres que possuem um ou mais fatores de risco nunca desenvolverão a doença, enquanto muitas mulheres com câncer de mama, por

exemplo, não possuem fatores de risco aparentes. Porém, esses fatores aliados à predisposição genética contribuem de forma mais acentuada para o desenvolvimento da doença do que isolados. Alguns fatores de risco influenciam mais do que outros dependendo do tipo de câncer como, por exemplo, o risco de câncer de mama variando com o decorrer do tempo por razões como envelhecimento e estilo de vida (AMERICAN BREAST CANCER, 2010), gravidez tardia, baixo número de filhos e diminuição do tempo de amamentação, aumento do índice de massa corporal, dieta com excessiva ingestão de gorduras associados com a “ocidentalização” da dieta alimentar são comumente associados ao aumento do risco (CHIA *et al.*, 2005; PORTER, 2008). Outros fatores podem contribuir para o aumento da incidência do câncer de mama, tais como: uso de pílulas anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal, obesidade na pós-menopausa e exposição a radiações ionizantes (NKONDJOCK e GHADIRIAN, 2005). Segundo a IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER), existe uma relação clara entre o tabagismo e o turno de trabalho, particularmente o noturno, com o risco aumentado para o surgimento do câncer de mama.

De acordo com o relatório da AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH/WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2008 (AICR/WCRF) sobre “Alimentos, Nutrição, Atividade Física e da Prevenção do câncer: uma perspectiva global”, 38, 28 e 20% de todos os casos de câncer de mama nos Estados Unidos, Brasil e China, respectivamente, poderiam ser evitados através de uma dieta saudável, atividade física regular e mantendo-se o peso corporal ideal. Dados da *American Cancer Society* estipularam para 2012, em todo o mundo, em torno de 577.190 mil mortes por câncer. Um terço dessas mortes, segundo cientistas, está relacionada à obesidade, inatividade física, má nutrição etc.

Vários estudos apontam que é possível prevenir-se contra o câncer trabalhando-se contra os fatores de risco. Embora não se conheça exatamente todo o mecanismo causal do câncer de mama, não há dúvida de que a interação entre os fatores genéticos e ambientais exerce papel fundamental na etiologia e na evolução dos casos. Isto fortalece a hipótese de que fatores relacionados à dieta, ao hábito de fumar, à ingestão de bebidas alcoólicas e à paridade – os quais são bem distintos se comparados países orientais com ocidentais – devem exercer um peso importante no processo de carcinogênese mamária. Ao mesmo tempo, é conhecida a influência dos fatores genéticos, sendo que filhas de mães portadoras de câncer de mama têm

um risco aumentado de desenvolver a doença se comparadas a mulheres sem relato de história familiar (PETO e HOULSTON, 2001).

A prática de amamentação é apontada pelo AICR/WCRF como fator protetor para a neoplasia maligna da mama, tanto em mulheres na pré-menopausa quanto na pós-menopausa. Vários estudos como os de Huo *et al.* (2008), BEABER *et al.*, (2008), STUEBE *et al.* (2009) apoiam a afirmação do AICR/WCRF. Huo *et al.* (2008) observaram a redução de 7% no risco de desenvolver câncer de mama a cada 12 meses de amamentação em uma população de mulheres nigerianas. Beaver *et al.*, (2008) estudando o efeito da amamentação entre os tipos de câncer de mama ductal, lobular e misto verificaram um efeito protetor significativo para o tipo ductal, sugerindo que os diferentes tipos podem ter diferentes etiologias. Já Stuebe *et al.* (2009), estudando a população feminina norte americana para o risco de câncer de mama entre mulheres lactantes e que nunca amamentaram, também encontraram diferenças favoráveis às que já tinham amamentado, porém neste estudo a diferença entre os grupos não foi significativa. Para Inumaru *et al.* (2011) o efeito protetor da amamentação pode estar associado à diferenciação completa das células mamárias e ao menor tempo de exposição à ação de hormônios sexuais, que se encontram diminuídos durante a amenorreia induzida pela lactação. Outro fator sugerido pelo AICR/WCRF é de que a intensa descamação e esfoliação das células da mama, decorrente do processo de amamentação, possa reduzir o risco do câncer de mama em função da eliminação recorrente de possíveis células que tenham sofrido algum dano no DNA.

O aumento de peso decorrente da dieta alimentar ocidentalizada, é um dos maiores responsáveis pelo aumento do risco de câncer de mama, podendo ser evitado com a prática de atividade física regular. A elevação da taxa de gordura corporal, principalmente na região abdominal, é muito acentuada em mulheres na pós-menopausa, e por isso esta prática é muito indicada para essas mulheres. Segundo Mathew *et al.* (2008), mulheres com a circunferência superior a 85 cm (centímetros), têm um risco maior de desenvolver câncer de mama na pós-menopausa do que as que estão na pré-menopausa. No estudo de Ahn *et al.* (2007), mulheres com a circunferência abdominal superior a 103 cm tinham a chance aumentada em 55% de desenvolver carcinoma mamário do que aquelas com medidas inferiores a 75 cm. O estudo caso-controle realizado por Sprague *et al.*

(2007) nos Estados Unidos para mulheres com carcinomas invasivos, encontrou risco diminuído para o câncer de mama naquelas que praticavam em média seis horas por semana de atividades físicas. Para Schimidit *et al.*, (2008), também em um estudo caso-controle com mulheres alemãs na pós-menopausa verificaram a relação entre a atividade física no lazer, trabalho ou no ambiente doméstico segundo o *status* dos receptores hormonais, características do tumor (*in situ* ou invasivo) e o período da vida de prática de exercício físico. Seus dados mostram um efeito protetor da prática de exercícios após os 50 anos de idade para o câncer de mama invasivo e o receptor positivo de estrógeno e progesterona (ER/PR+).

A ingestão de bebida alcoólica também vem sendo estudada e associada ao aumento do risco para o câncer de mama em mulheres em todo o mundo. Deandrea *et al.* (2008) constataram que na Itália a ingestão aumentada de bebida alcoólica (acima de 13,8 g/dia) elevou o risco de câncer de mama quando comparado a mulheres que nunca fizeram uso de bebida alcoólica. Porém, na análise do mesmo estudo, agora para o *status* dos receptores, o efeito de risco foi observado apenas para receptores de estrógenos positivos. Na mesma linha, Zang *et al.* (2007), observaram nas estadunidenses a contribuição do álcool para os cânceres de mama *in situ*, invasivo e *status* dos receptores hormonais (ER/PR). Seus resultados mostram que com o aumento de 10g (gramas) no consumo de bebida alcoólica por dia provocou um aumento de 7% no risco de desenvolvimento do câncer de mama *in situ*, e de 9% no risco de câncer de mama invasivo.

Dentre os fatores que podem aumentar o risco de surgimento de câncer de mama estão a presença de casos na família (indicando um forte histórico familiar), mutações nos genes *BRCA* (principal categoria de genes envolvidos no câncer de mama), se a biópsia da mama mostrar alterações pré-cancerosas (AMERICAN BREAST CANCER, 2010). Dentre os genes associados os mais conhecidos são *BRCA1* e *BRCA2*, embora mutações em outros genes conhecidos também tenham sido encontradas em pacientes com câncer de mama. O primeiro destes genes a ser descoberto foi o *BRCA1*, que foi mapeado no braço longo do cromossomo 17, a partir de análises de ligação envolvendo famílias com numerosos casos de câncer de mama (HALL *et al.*, 1990), sendo clonado quatro anos mais tarde, em 1994. No ano seguinte, o segundo gene de suscetibilidade ao câncer de mama, foi mapeado no braço curto do cromossomo 13 (WOOSTER *et al.*, 1995) e posteriormente clonado. As prevalências estimadas para portadores de mutações em *BRCA1/2*

são, respectivamente, 0,11% e 0,12% na população geral e entre 12,8% e 16% em famílias com três ou mais casos de câncer de mama ou ovário, caracterizadas como de alto risco (BOUCHARD *et al.*, 2004).

Indivíduos com forte histórico familiar para câncer de mama, ou em outros locais, como ovário e cólon, devem considerar aconselhamento para determinar se o teste genético para mutações nos genes de suscetibilidade deve ser realizado (AMERICAN BREAST CANCER, 2010).

1.5 DETECÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

À medida que o câncer de mama progride, ele se torna cada vez mais agressivo ao paciente. Tipicamente, este não produz sintomas quando a massa tumoral é pequena, sendo que neste período é mais facilmente tratado indicando a importância da detecção precoce (AMERICAN BREAST CANCER, 2012). A detecção do câncer de mama em seu estado inicial e o uso de tratamentos multimodais agressivos tem resultados satisfatórios no decréscimo da mortalidade decorrentes desta neoplasia. O prognóstico e fatores preditivos têm sido amplamente usados na decisão do tratamento. Estes fatores incluem a extensão do envolvimento dos linfonodos axilares, grau histológico, idade do paciente, *status* dos receptores hormonais (ER/PR) e receptor de fator de crescimento epidermal (HER2), e envolvimento dos vasos linfáticos ou espaços microvasculares (WOOD *et al.*, 2005).

O tratamento envolve a radioterapia, quimioterapia (antes e depois da cirurgia), hormonioterapia (tamoxifeno, inibidores de aromatase) ou visam alvos terapêuticos (trastuzumabe). Mulheres na pós-menopausa com câncer de mama cujos tumores apresentam-se com receptores hormonais positivos (HR+) podem reagir positivamente ao tratamento com inibidor de aromatase (por exemplo, letrozol, anastrozol, ou exemestano), seguido ou ao invés de tamoxifeno. Para mulheres com amplificação de HER2 o tratamento mais indicado é o Trastuzumabe (Herceptina) e para doenças avançadas, Lapatinibe (AMERICAN BREAST CANCER, 2012).

A cirurgia é um dos tratamentos mais efetivos para pacientes com cânceres de mama. Contudo, recorrências e metástases são frequentemente observadas posteriormente ao procedimento, o que pode comprometer os efeitos terapêuticos. Há três formas de cirurgias mamárias que são realizadas, a ressecção segmentar (ou quadrantectomia), adenectomia e a mastectomia radical. Estes procedimentos quase sempre são acompanhados da dissecação dos linfonodos axilares, total ou parcial guiada pela biópsia do linfonodo sentinela, o qual é o primeiro linfonodo da rede linfática a ser marcado pelo corante para identificar presença de células metastáticas. A mastectomia é a retirada total da mama, com pele, aréola e mamilo, muito utilizada em tumores extensos. A adenectomia é uma modificação da mastectomia onde se preserva a pele, aréola e mamilo, porém com a retirada de

todo o corpo glandular. Esta técnica é mais utilizada para tumores pré-infiltrativos ou para pequenos tumores multicêntricos. Quando os carcinomas atingem até três centímetros (ou mais em mamas volumosas), é utilizada a técnica de remoção parcial da mama, chamada de ressecção segmentar ou quadrantectomia. Nesta técnica se faz necessária a presença de um patologista durante a cirurgia para assegurar que as margens do tecido retirado estejam livres da neoplasia (RIETJENS E URBAN, 2009).

A quimioterapia foi introduzida como método terapêutico ou preventivo para recorrência ou metástase depois da cirurgia, pois poderia prolongar a sobrevida do paciente (GONG *et al.*, 2012). Porém, também mostrou vários efeitos severos sobre o pacientes, tais como imunossupressão e mielossupressão, os quais limitavam drasticamente a intensidade da mesma e diminuía a qualidade de vida do paciente (ARMSTRONG *et al.*, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de dois terços dos pacientes com câncer de mama utilizam a radioterapia em alguma fase do tratamento da doença, seja de maneira isolada ou associada a outras formas de terapia oncológica. Segundo dados da metanálise do *Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group* (EBCTCG), que avaliou 400 estudos prospectivos e aleatorizados com mais de 400 mil mulheres alocadas, o emprego da radioterapia apresentou em torno de 65% de redução da recidiva locorregional em comparação à sua omissão, além de tendência a ganho em sobrevida global. A indicação da radioterapia após a cirurgia mamária se define pelo risco básico de recidiva, sendo esta inferior a 10% permite a opção de omissão da radioterapia (HANRIOT, 2011).

Quando diagnosticado e tratado oportunamente, o prognóstico é relativamente bom. Porém, o câncer de mama continua sendo a maior causa de morte em mulheres, mesmo com campanhas de prevenção, diagnóstico precoce, avanços no tratamento e melhor entendimento da patogênese molecular (FUCITO *et al.*, 2008).

1.6 ESTADIAMENTO DO CÂNCER

O sistema mais utilizado para estadiamento do câncer é o sistema TNM que considera o tamanho do tumor primário (T), presença ou ausência de metástases em linfonodos (N) e de metástases à distância (M). Obviamente, estes padrões variam dependendo da localização do câncer (pulmão, mama, cérebro etc.). O sistema TNM para carcinomas mamários, de acordo com o INCA (2012), pode ser compreendido como:

Tumor primário

Tx: o tumor primário não pode ser avaliado

T0: não há evidências de tumor primário

Tis: Carcinoma *in situ*:

Tis (CDIS) – Carcinoma ductal *in situ*

Tis (CLIS) – Carcinoma lobular *in situ*

Tis (Paget) – Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama

T1: tumor com menos três centímetros em sua maior dimensão, porém bastante restrito.

T2: tumor com três centímetros ou mais em seu maior diâmetro ou causando comprometimento moderado aos tecidos adjacentes.

T3: Tumor de qualquer dimensão invadindo tecidos próximos causando sério comprometimento.

T4: Tumor de qualquer tamanho invadindo e comprometendo órgãos vitais.

Linfonodos Regionais

Nx: Metástases linfonodais não identificadas.

N0: Ausência de metástases em linfonodos regionais.

N1: Metástase em linfonodo(s) axilar (es), homolateral (ais), móvel(eis).

N2: Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es).

N3: Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente em

linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s).

Metástase à distância

Mx: A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0: Ausência de metástase à distância.

M1: Metástase à distância.

De acordo com a OMS, os carcinomas mamários são classificados quanto à sua localização e extensão, em carcinoma *in situ* e invasor e, conforme sua origem em ductais, que têm seu desenvolvimento nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores, e lobulares, que se desenvolvem no interior dos lóbulos, e representam entre 10 a 15% dos casos (BOGLIOLO, BRASILEIRA, ROCHA, 2006; VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). O câncer de mama ductal inicia-se com a fase pré-maligna de hiperplasia ductal atípica (HDA), progride para o estágio pré-invasivo do carcinoma ductal *in situ* (DCIS), e culmina no estágio potencialmente letal de carcinoma ductal invasivo (IDC) (ALLRED, MOHSIN, FUQUA, 2001).

O prognóstico da doença é baseado, atualmente, em parâmetros histológicos e clínicos, como a presença ou ausência de linfonodos axilares metastáticos, tipo e tamanho do tumor e presença ou ausência de receptores hormonais (estrógeno e progesterona). Dentre esses, a presença de linfonodos axilares metastáticos confere um alto risco de recorrência da doença, além do seu *status* se um dos mais importantes indicadores de prognóstico para o câncer de mama, e valor particular na escolha da terapia adjuvante (VERONESI, *et al.*, 2009). Estes clássicos critérios de classificação tumoral são, até o momento, os mais importantes fatores prognósticos. No entanto, informações adicionais como, por exemplo, a amplificação do gene *ERBB2* também é considerada um fator prognóstico relevante (FARANTE *et al.*, 2010) e busca-se a identificação de outros marcadores, através de diversas metodologias.

Devido ao carcinoma mamário ser muito heterogêneo, as diferentes classificações utilizam dados dos aspectos morfológicos, imunohistoquímicos, clínicos e genéticos específicos. Além do gene *ERBB2*, receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) auxiliam na classificação dos cânceres de mama, sendo

muito útil na predição do prognóstico e no direcionamento do tratamento, por exemplo, uso de Tamoxifeno para portadoras de ER e PR positivos determinados pela imunohistoquímica, enquanto a identificação da amplificação ou superexpressão do oncogene *ERBB2* direciona para o uso de anticorpo monoclonal humanizado Trastuzumabe (SLAMON *et al.*, 2001). Porém, alterações biológicas devido à progressão do câncer decorrente das metástases podem mudar o tipo de tratamento do mesmo paciente durante o processo (SIMONS *et al.*, 2009). Vários estudos demonstram que receptores hormonais mudam rapidamente enquanto há poucas mudanças em *ERBB2* (WILKING *et al.*, 2007; AMIR *et al.*, 2008).

O processo de progressão do tumor no câncer de mama é muito complexo e aparentemente inclui mudança no comportamento do tumor (HANAHAN e WEIBERG, 2011). O aumento do tamanho do tumor tem sido associado tanto com o aumento do risco de recidiva quanto à presença de marcadores de agressividade como envolvimento de linfonodos e grau histológico (SINGLETARY *et al.*, 2002).

1.7 GENES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA

Além dos já citados *BRCA1/2*, outros genes são associados ao câncer de mama. Genes-chaves (*HER2*, *PI-3K/AKT*, *COX2*, *MMP1/2*, *β-catenina*, *VEGF*, *ERp5*) medeiam a metástase e a sobrevivência em órgãos vitais diferentes dos de origem do tumor facilitando a formação de novos vasos sanguíneos nos tumores, a liberação de células tumorais na circulação e o rompimento de capilares para formar metástases (GUMIREDDY *et al*, 2007; GUPTA *et al*, 2007; MIN *et al.*, 2007).

Embora vários fatores prognósticos sejam conhecidos, o *status* dos linfonodos regionais à mama permanecem como o fator mais utilizado na prática clínica. Pacientes que são diagnosticados com metástase axilar têm um prognóstico muito pior do que aqueles onde a metástase não atingiu esta região, além de que o número maior de linfonodos positivos para presença de metástase se associa à recidiva mais precoce e diminuição da sobrevida do paciente (BADER *et al.*, 2002; RICCI e JUNQUEIRA, 2008). A angiogênese (processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes) vem sendo fortemente associada às metástases do tumor. Este processo é parte importante do desenvolvimento do tumor e está envolvido na habilidade dos cânceres desenvolverem metástases, em consequência do alto nível de atividade angiogênica prediz um pior prognóstico ao câncer de mama (VONA-DONIS e ROSE, 2009). As alterações genéticas associadas ao surgimento de tumores envolvem, principalmente, a expressão aumentada de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores tumorais (RODENHISER e MANN, 2006), resultando na desregulação da proliferação celular, seleção clonal e formação do tumor, ou seja, na instabilidade genômica que é gerada pela ruptura dos mecanismos de controle. Dentre os genes com reconhecido papel no prognóstico das pacientes, podemos citar o oncogene *ERBB2* (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*)(*HER2*) e o gene supressor de tumor *TP53* (*tumor protein p53*). O *ERBB2* está amplificado e/ou superexpresso em 20 a 30% dos cânceres de mama invasivos (ALLRED *et al.*, 2001), sendo relacionado ao pior prognóstico do paciente com câncer de mama, e também associado a alta incidência de metástase no cérebro (LAI *et al.*, 2004; WEIL *et al.*, 2005). O gene *TP53* também aparece como importante na evolução do câncer de mama pré-maligno. Este gene supressor de tumor está mutado em cerca de 30%

dos carcinomas mamários invasivos, sendo associado a características biológicas agressivas e a um pior prognóstico da doença (BORRESEN-DALE, 2003). O gene *TP53* normal, codifica uma fosfoproteína de 53 kDa, tetramérica, a qual se liga ao DNA e age como fator de transcrição. Mutações neste gene, localizado no cromossomo 17, estão presentes em aproximadamente 50% dos cânceres humanos, tornando este gene o alvo mais comum de alterações genéticas no processo neoplásico (PETITJEAN *et al.*, 2007). Quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA (radiação ionizante, radiação ultravioleta, aplicação de fármacos citotóxicos ou agentes quimioterapêuticos), a proteína se torna estável e passa a controlar diversos genes que são seus alvos, impedindo a progressão do ciclo celular, o que permite reparar os danos nas células ou disparar o processo de morte celular por apoptose (BAI e ZHU, 2006).

Embora haja uma variedade de alterações moleculares descritas, ainda não se compreende o significado patogenético destes eventos e como eles se relacionam com os vários estágios da progressão da doença (POLYAK, 2007).

1.8 A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Recentes estudos sugerem que devido à heterogeneidade do câncer de mama, pacientes com o mesmo diagnóstico e perfil clínico podem apresentar marcadamente diferentes resultados ao tratamento (RHEE, *et al.*, 2008).

Perou *et al.* (2000) classificaram os carcinomas mamários de acordo com o perfil da expressão gênica, demonstrando a heterogeneidade destes tumores e introduzindo a classificação em nível transcricional. Os estudos iniciais demonstraram que os perfis de expressão gênica mantêm uma variação sistemática que permite a classificação em cinco grupos distintos: dois grupos ER positivos referidos como Luminais (A e B) devido ao padrão de expressão similar ao das células epiteliais, presentes na camada interna do ducto mamário; um grupo com amplificação do gene e expressão aumentada da proteína ERBB2/HER2 (*HER2+*); um grupo com expressão semelhante à das células normais com alta expressão de genes da camada basal e baixa expressão de genes da camada luminal (*normal breast-like*) e, um quinto grupo que foi previamente reconhecido como um subgrupo semelhante ao basal (*basal-like*).

Os subgrupos *basal-like* e *HER2+* possuem maior taxa de recidiva e menor sobrevida dos pacientes em relação aos tumores luminais (PEROU *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2004;). Um subgrupo denominado de cânceres de mama “triplo negativos” (TN), definidos como receptor de estrogênio negativo (RE-), receptor de progesterona negativo (RP-), e HER2 negativo tem chamado a atenção nos últimos anos. Aproximadamente 80 a 90% dos cânceres de mama com fenótipo triplo negativo são definidos como *basal-like* quando testados, apropriadamente, para marcadores de imunohistoquímica e expressão gênica. Além disso, existe uma tendência consistente em todos os estudos que confirma os resultados clínicos desfavoráveis associados tanto ao fenótipo TN como ao câncer de mama tipo *basal-like* (SORLIE *et al.*, 2001; CAREY *et al.*, 2007).

Estes cinco grupos vinham sendo os mais utilizados para a classificação do câncer de mama, porém recentemente um estudo financiado pelo governo dos Estados Unidos demonstrou que através da integração de diversas plataformas de análise foi possível classificar os cânceres de mama em quatro grupos: Luminal A, Luminal B, *basal-like* e *HER2E (HER2 enriched)* (THE CANCER GENOME ATLAS

NETWORK, 2012). Este estudo sugere novas estratégias para o tratamento dos diferentes tipos de câncer de mama, mas, principalmente, a indicação de uma abordagem terapêutica comum entre os portadores do subtipo basal e de carcinomas ovarianos, devido à similaridade da expressão gênica de ambos. A classificação molecular do câncer de mama tem revelado a heterogeneidade da doença com respeito ao prognóstico e resposta a terapia (RHEE *et al.*, 2008).

1.9 PROTEÍNAS DISSULFETO ISOMERASES

Depois que as proteínas são produzidas, elas devem ser dobradas na forma tridimensional para funcionar corretamente. As células usam múltiplos mecanismos para que as proteínas sejam produzidas com sua exata conformação. Em células eucarióticas, proteínas da membrana plasmática entram no lúmen do retículo endoplasmático (RE), onde serão modificadas e dobradas de acordo com a sua estrutura correta. A proteína dissulfeto isomerase (PDI) é membro multifuncional da superfamília tiorredoxina, possui multidomínios, e se expressa na maioria dos tecidos e órgãos sendo uma das proteínas mais abundantes do RE que estão envolvidas no transporte e processamento. Estas proteínas são caracterizadas pela presença de um ou mais domínios de 95 a 110 aminoácidos relacionados com a proteína citoplasmática tiorredoxina (FERRARI e SOLING, 2000). Tiorredoxinas são pequenas proteínas de aproximadamente 12 kDa, que estão envolvidas em processos antioxidantes, facilitando a redução de outras proteínas, dentre outros processos celulares (NORDBER e ARNÉR, 2001). As dissulfeto isomerases são proteínas responsáveis pela formação e quebra de ligações chamadas pontes de dissulfeto. Cada ponte dissulfeto conecta dois átomos de enxofre que fazem parte do complexo de formação das cisteínas. Os átomos de enxofre são parte de um bloco de construção específico das cisteínas. Pontes dissulfeto auxiliam no dobramento de proteínas por conectar as cisteínas em diferentes regiões das mesmas (FIGURA 5).

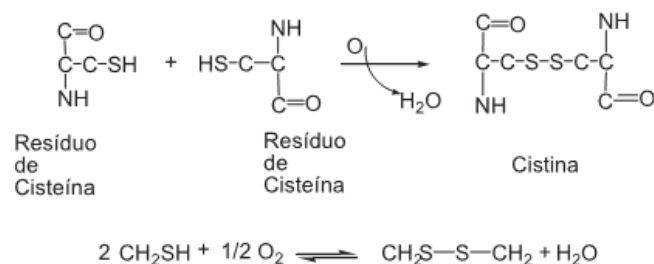


FIGURA 5: REAÇÃO DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DA CISTINA NA FORMAÇÃO E QUEBRA DE PONTES DISSULFETO NA MOLÉCULA DE PROTEÍNA.

Estas pontes estabilizam a proteína e lhe conferem a forma adequada para realizar a sua função particular. Além desta função, a PDI também atua como uma chaperona podendo tanto inibir a destruição das proteínas desnaturadas quanto

auxiliar na renaturação dos polipeptídeos. Estas proteínas foram observadas pela primeira vez em 1963, a partir de extratos de fígado, pelo trabalho do grupo *Anfinsen* (GOLDBERGE, EPSTEIN, ANFISEN, 1963). Desde então, foram observadas em diversos tipos de tecidos e órgãos, sendo altamente conservadas entre as espécies.

Estresses citotóxicos tais como hipóxia, privação de nutrientes, reações de redução/oxidação (redox) e desregulação do Ca^{+2} , podem induzir acúmulos de proteínas mal dobradas ou desdobradas. Proteínas mal formadas podem ter sua função prejudicada, ou mesmo se agregar e interagir com outras funções celulares. Este processamento incorreto pode levar à morte celular, sendo resultado da ativação das vias de sinalização de estresse celular pelo acúmulo de proteínas mutadas ou deformadas no retículo endoplasmático (RAO, ELLERBY, BREDESEN, 2004). Devido ao RE ser tão importante para o processamento correto das proteínas, vários estudos investigam as consequências do estresse nesta organela, assim como os mecanismos que protegem as células do mau funcionamento desta organela. Em alguns estudos, vias de estresse do RE foram ativadas em células tumorais como resultado da hipóxia e outros fatores ambientais (FELDMA, CHAUHAN, KOONG, 2005; KOSHIKAWA *et al.*, 2006).

A chaperona PDI tem sido descrita como funcionalmente envolvida na renaturação de proteínas, com ou sem pontes dissulfeto, como a GAPDH, e superexpressa em linhagem celular MCF7-SEL1L (linhagem celular epitelial da mama humana bem diferenciada, derivada da infusão pleural de adenocarcinoma). O aumento nos níveis de PDI pode desempenhar um importante papel no dobramento de proteínas e na resposta ao estresse celular (BIANCHI *et al.*, 2005).

PDI tem sido descrita como uma proteína induzida por hipóxia em alguns modelos *in vitro* e *in vivo* levando a um aumento nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) e proteínas em células endoteliais das artérias pulmonares e aórticas humanas (GRAVEN *et al.*, 2002; MYOISHI *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2009). Respostas apropriadas para a queda dos níveis de oxigênio no ambiente celular são extremamente necessárias para a sobrevivência das células dos mamíferos. Estas respostas governam uma gama de processos fisiológicos, para manutenção da ventilação, níveis de ATP (Adenosina trifosfato) celular para a produção de vários agentes mitogênicos, imunológicos, e substâncias vasoativas. Diversos estudos têm mostrado que muitas destas respostas para hipóxia estão relacionadas à expressão gênica. A lista de genes regulados por hipóxia inclui eritropoetina, fator de

crescimento vascular endotelial, endotelina, xantina-oxidase, interleucina-6, etc. (GRAVEN *et al.*, 2002).

Muitos passos são realizados no processamento das proteínas, sendo que o retículo endoplasmático é uma importante organela envolvida neste processo. O dobramento de polipeptídeos recém-sintetizados e modificações pós-traducionais importantes para o dobramento e função das proteínas são realizados no RE. Se ocorre um excedente no desdobramento de proteínas em relação ao dobramento ou capacidade de processamento do RE, o estado fisiológico normal é perturbado. Nestas condições, vias sinalizadoras, chamadas de *Unfolded protein response* (UPR), são ativadas para estabelecer, novamente, o equilíbrio desta organela. Esta situação é um exemplo de resposta ao estresse do RE (SCHRODER E KAUFMAN, 2005).

Estudos indicam que ocorre a ativação da UPR em várias doenças como o Alzheimer (IMAIZUMI *et al.*, 2001) e Creutzfeldt-Jakob (HETZ *et al.*, 2003) onde proteínas sem conformação acumulam-se no retículo endoplasmático. Muitos aspectos da UPR são citoprotetores, e vários estudos indicam que a ativação de UPR pode ter um papel crucial no crescimento tumoral. Contudo, ativação prolongada da resposta poderia iniciar a apoptose, o que serviria como uma proteção contra o tumor. Porém, não está bem claro onde este equilíbrio atua no desenvolvimento tumoral. Esta ativação também foi observada em cultura de células mostrando alteração na quimiosensibilidade de tumores, tornando-os mais sensíveis a certos medicamentos e mais resistentes a outros, destacando o fato de que a ativação da UPR pode levar a diferentes consequências dependendo do tipo do tumor (MA e HENDERSHOT, 2004).

Os resultados encontrados por González-Santiago *et al.* (2007) demonstram que variações nos níveis de expressão de algumas PDIs pela utilização de um inibidor específico de dissulfeto isomerases (Bacitracina) em culturas de células HeLa-R, podem alterar a ação e/ou resistência à Aplidina, que é um composto antitumoral usado contra uma grande variedade de neoplasias por ser um potente indutor de apoptose. PDI também foi descrita como um regulador negativo do fator nuclear κ - β , um indutor importante de sobrevivência das células, regulando numerosos genes (HIGUCHI, WATANABE, WAGA, 2004).

1.10 OS GENES *PDIA3* E *PDIA6* E SEUS PRODUTOS PROTEICOS

As proteínas da classe das chaperonas pertencem à família das proteínas de choque térmico, protegendo contra o estresse oxidativo, e regulando a dinâmica de vários componentes celulares, tais como o citoesqueleto, filamentos e polímeros tubulares compostos por microtúbulos, microfilamento e filamento intermediário (LIANG e MACRAE, 1997). É dentro desta classe que se encontram as *PDIA3* e as *PDIA6* (Proteínas dissulfeto isomerase da família 3 e 6, respectivamente), esta última apresentando duas isoformas resultantes de *splicing* alternativo (ENSEMBL, 2011; UNIPROTKB/ SWISS-PROT, 2011).

A *PDIA3*, ERp57 (Proteína de 57kDa do retículo endoplasmático), codificada pelo gene *PDIA3*, localizado no cromossomo 15 (15q15.3) (ENSEMBL, 2011), está envolvida na resposta celular ao estresse no RE, sendo que o nível de expressão dessa proteína aumenta em resposta ao estresse devido à sua função de chaperona. Sua atuação na resposta celular ao estresse como proteína superexpressa foi observada primeiramente junto com GRP78 e GRP94 (Proteínas reguladoras de glucose de 78 e 94 kDa, respectivamente) em resposta à privação de glucose, neste estágio também é chamada de GRP58 (Proteína reguladora de glucose de 58 kDa) (LEE, 2003). Além dessas funções muitas outras já foram atribuídas à *PDIA3*, tais como fosfolipase C (BENNETT *et al.*, 1988), protease (URADE e KITO, 1992), carnitina palmitol transferase (MURTHY e PANDE, 1994), e atividades redutases (SRIVASTAVA *et al.*, 1991).

Esta proteína está presente em múltiplas localizações subcelulares, como no retículo endoplasmático, membrana plasmática, citosol e núcleo (GUO *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2010). No citosol tem sido associada com STAT3 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) fosforilada em células de hepatoma (NDUBUISI *et al.*, 1999), e com um transportador de cloreto de sódio em células renais (WYSE *et al.*, 2002). Já no núcleo, *PDIA3* tem sido encontrada em células de aves (ALTIERI *et al.*, 1993) e mamíferos (COPPARI *et al.*, 2002), principalmente associada à matriz nuclear interna e ligada ao DNA. Também já foi encontrada *PDIA3* interagindo com um potencializador do gene da α 2-macroglobulina em associação com STAT3 nuclear em células de melanoma, onde STAT3 está constitutivamente ativada (EUFEMI *et al.*, 2004). Experimentos *in vitro* mostraram que *PDIA3* liga-se preferencialmente a sequências de DNA que possuem características de S/MARs

(sequências relativamente longas no DNA genômico através da qual a cromatina é anexada à estrutura da matriz nuclear) (FERRARO *et al.*, 2004).

A chaperona de retículo endoplasmático PDIA3, juntamente com calnexina e a calreticulina, está envolvida na formação de antígenos classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (LINDQUIST *et al.*, 2001). PDIA3 parece participar do reparo do DNA em, pelo menos, dois diferentes mecanismos: primeiro, PDIA3 é um componente do complexo que reconhece danos no DNA, e o outro é que esta proteína liga-se, possivelmente como um fator regulatório, a genes que codificam conhecidas proteínas de reparo (CHICHIARELLI *et al.*, 2007).

PDIA3 já foi encontrada cooperando com REF-1 (Fator efetor de redox-1), uma proteína envolvida no reparo do DNA, que é um potente ativador de *TP53* (JAYARAMAN *et al.*, 1997; GRILLO, D'AMBROSIO, SCALONI, 2006). Em células leucêmicas humanas Nalm6, um complexo nuclear formado por PDIA3, HSC70 (Proteína de choque térmico de 70 kDa), HMG1, HMG2 (Proteína de alta mobilidade do grupo 1 e 2, respectivamente) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tem sido descrito. Este complexo tem sido capaz de detectar mudanças na estrutura do DNA causadas por incorporação de nucleotídeos artificiais (KRYNETSKI *et al.*, 2003). PDIA3 sozinha é capaz de se ligar ao DNA, esta propriedade, que é dependente do estado redox da proteína, tem sido detectada em ambos os ensaios, *in vivo* e *in vitro* (GRILLO *et al.*, 2002; FERRARO *et al.*, 2004). PDIA3 pode ter um papel regulatório na transcrição, uma vez que são capazes de alterar o estado de dimerização dos fatores de transcrição E2A, com uma consequente modulação da sua atividade (CHICHIARELLI *et al.*, 2010). PDIA3 mostrou-se essencial para a fosforilação da histona H2AX, uma variante da H2A, presente em um subgrupo de nucleossomos. Provavelmente, a fosforilação desta proteína se estende por vários nucleossomos, marcando a cromatina para o recrutamento de enzimas sinalizadoras de danos e de reparo. Corazzari *et al.* (2007) analisando o efeito da PDIA3 em linhagem celular de melanoma (A375), correlacionaram esta proteína ao processo de apoptose após indução ao estresse no RE, com um efeito anti-apoptótico. Porém, Pressinotti *et al.* (2009) relacionaram a diminuição da atividade das caspases com a baixa regulação da PDIA3 em linhagem celular de câncer de próstata.

O estudo de Pressinotti *et al.* (2009) investigou a expressão diferencial do gene *PDIA3* entre o câncer de próstata de baixa e alta agressividade. Relataram que na próstata, a PDIA3, além do papel de chaperona, também parece desempenhar

um papel como uma proteína pró-apoptótica. Leys *et al.* (2007) demonstraram em seus estudos que a falta de expressão desta proteína está associada ao aumento da invasão tumoral e ao estágio avançado no câncer gástrico e, portanto, foi proposto considerá-la como um potencial marcador de prognóstico negativo.

A proteína PDIA6, também chamada de ERp5 (Proteína 5 do retículo endoplasmático), é codificada pelo gene *PDIA6*, possuindo os sinônimos *ERP5* e *TXNDC7* (*thioredoxin domain containing 7*), localizado no cromossomo 2 (2p25.1) (ENSEMBL, 2011). Em humanos, pode funcionar como uma chaperona, inibindo a agregação de proteínas mal formadas, desempenha um papel na agregação plaquetária e ativação por agonistas tais como convulxina, colágeno e trombina. Interage com MICA (polipeptídeo relacionado à sequência A do MHC de classe I) na superfície de células tumorais, levando à redução da ligação dissulfeto com MICA que é necessária para a sua liberação a partir de células do tumor (KAISER *et al.*, 2007; ENSEMBL, 2011; UNIPROTKB/ SWISS-PROT, 2011).

PDIA6 é expressa na superfície de células de mieloma onde tem sido associado com secreção de sMICA (MICA solúvel) (JINUSH *et al.*, 2008). A relevância clínica da expressão de *PDIA6* na superfície de células tumorais é realçada pela associação de anticorpos anti-ERp5 em resposta a imunoterapia em diversos tumores sólidos e paciente com leucemia mieloide (FONSECA *et al.*, 2009). O estudo realizado por Huergo-Zapico *et al.* (2012), mostrou que a expressão do gene *PDIA6* em células B de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) era significativamente maior do que a encontrada no mesmo tipo celular em pacientes saudáveis. Estes dados são corroborados por outros estudos, que mostraram células de LLC com atividade de PDI dez vezes maior do que nos controles (TAGER *et al.*, 2007).

A expressão de *PDIA6* também foi observada como aumentada em pacientes com mieloma múltiplo em relação aos pacientes com gamopatia monoclonal de significado indeterminado (JINUSHI *et al.*, 2008). O produto do gene *PDIA6* já se mostrou como um promotor *in vitro* e *in vivo* de invasão e metástase em modelo de camundongos que apresentavam câncer de mama, através da ativação do receptor EGF (*epidermal growth factor*) e da via ERBB2/PI3K (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*/Fosfoinositida 3-quinase), e a jusante das moléculas sinalizadoras incluindo AKT (serina-treonina quinase) e RHOA (GTPase, em humanos, codificada pelo gene *RHOA*) (GUMIREDDY *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

A grande dificuldade, porém instigante, para as pesquisas do câncer de mama em humanos é a caracterização dos eventos moleculares que estão associados à gênese e à progressão tumoral. A análise de proteínas secretadas pelas células tumorais, assim como a expressão dos genes que as codificam, são estratégias promissoras na identificação de possíveis biomarcadores para o câncer. O estudo da expressão gênica vem sendo utilizado para avaliar genes que possam estar relacionados ao surgimento e progressão de todos os tipos de câncer, e assim fornecer melhores previsões de resultados clínicos do que as técnicas tradicionais. A comparação entre as células de tecido tumoral e normal é uma ferramenta importante para a obtenção destes dados. As primeiras aplicações das técnicas de biologia molecular à oncogenética tiveram por objetivo fazer uma comparação entre células normais e tumorais em relação à expressão de alguns genes isolados, como *TP53*, *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) e muitos outros (ADELL *et al.*, 1999; BRINK *et al.*, 2003).

Estudos de análise do proteoma realizados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, UFPR (Universidade Federal do Paraná) (OLIVEIRA, 2011), onde amostras de carcinomas ductais e lobulares foram comparadas, mostraram um aumento significativo de expressão das proteínas dissulfeto isomerase A3 e A6 nos tumores ductais. O trabalho de Oliveira (2011) sugere que o aumento dos níveis de expressão das proteínas PDIA3 e PDIA6, observados nas amostras de carcinoma ductal, seja uma decorrência de estímulos como o estresse oxidativo e hipóxia, ou também um mecanismo compensatório para suprir o provável *déficit* de ATP, sugerindo um papel importante destas proteínas na tumorigênese. Em estudo semelhante, realizado em amostras de tecido mamário tumoral e de tecido normal adjacente, foi demonstrado aumento de expressão destas proteínas no carcinoma mamário (ALLDRIDGE *et al.*, 2008).

A literatura atual é controversa em relação à expressão destas proteínas em diversos tipos de carcinomas, ora apontando para um importante papel para a deficiência (quando deixaria de inibir a apoptose), ora para o aumento da expressão (quando aumentaria a capacidade invasiva). Neste trabalho, investigamos o perfil de expressão destes genes nos carcinomas esporádicos e primários da mama

humana, com o objetivo de avaliar sua expressão em relação ao tecido normal e aos parâmetros clínicos e laboratoriais.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral analisar a expressão dos genes *PDIA3* e *PDIA6* visando contribuir para o esclarecimento do envolvimento das proteínas correspondentes no câncer de mama humano, bem como a possível identificação de marcadores moleculares para esta doença.

Os objetivos específicos são:

- a) Caracterizar e comparar a expressão destes genes em carcinomas mamários em relação ao tecido não tumoral.
- b) Verificar a associação dos níveis de expressão com o grau histológico, tamanho do tumor, presença ou ausência de metástase em linfonodos, receptores hormonais, amplificação de *ERBB2*, recidiva, metástase em sítios distantes e óbito.

4. CAPÍTULO I

ARTIGO

***PDIA3* and *PDIA6* genes expression as an aggressiveness marker in primary ductal breast cancer.**

Fabiano Santos Ramos^a, Leandro Tamião Rodrigues Serino^a, Cecília Mayumi Shimoida de Carvalho^a, Rubens Silveira de Lima^b, Cicero Andrade Urban^b, Iglénir João Cavalli^a, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro^{a*}

^aLaboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Genetics Department, Federal University of Paraná. P.O. Box 19071, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

^bBreast Unit, Hospital Nossa Senhora das Graças. Rua Alcides Munhoz, 433 - Mercês, 80810-040, Curitiba, Paraná, Brazil

Summary

Changes in expression of genes *PDIA3* and *PDIA6* may increase endoplasmic reticulum stress leading to cellular instability and neoplasia. Using RT-qPCR we analyzed the expression of these genes at mRNA level in 45 samples of invasive ductal carcinomas, in comparison with normal breast samples. An increased expression of *PDIA3* gene in carcinomas ($p= 0.0009$) was observed. In addition, the expression of *PDIA3* was increased in tumors with lymph node metastasis ($p = 0.009$) when compared to tumors with no metastasis and when different histological grades were analyzed (higher expression in grade III, $p<0.02$). The *PDIA6* gene expression showed higher expression levels in the presence of lymph node metastasis ($U= 99.00$, $p= 0.0476$) and lower expression for negative hormone receptors status ($p= 0.0351$). Our results suggest that alterations in the levels of expression of *PDIA3/6* may play a role in breast carcinogenic process and should be further investigated as a marker of aggressiveness.

Keywords: tumorigenesis, stress response, protein disulfide isomerases, metastasis.

Introduction

Cancer is a genetic, multifactorial disease, which is triggered by genomic alterations [1] that result in changes in expression of oncogenes and tumor suppressor genes [2]. It is characterized by uncontrolled cell cycle and invasion of adjacent or distant tissues (metastasis). Breast cancer is the second most common type of cancer in women worldwide, corresponding to 22% of new cases of cancer and the leading cause of death every year [3]. In Brazil, according to the National Cancer Institute [4], the number of new cases of breast carcinomas estimated for 2012 was 52,680, with an estimated 52 cases per 100 000 women.

The proteins disulfide isomerases (PDIs) are responsible for the formation and isomerization of disulfide bonds, assisting in protein folding. In addition, PDIs also act as chaperones, inhibiting the aggregation of unfolding substrates and/or assisting in the refolding of polypeptides [5].

Cytotoxic stresses such as hypoxia, nutrient deprivation, reactions of reduction/oxidation (redox) and Ca^{+2} deregulation can induce accumulation of unfolded or misfolded proteins. This incorrect processing can lead to cell death, as a result of the activation of signaling pathways of cellular stress by accumulation of deformed or mutated proteins in the endoplasmic reticulum (ER) [6]. Several other processes have already been associated to these proteins, like homeostatic responses that prevent or attenuate the risk of apoptosis by ER stress and hypoxia-induced ER stress response pathways activation [7-8]. The *PDIA3* gene presents high expression level in response to cellular stress due to its product function as a chaperone. It has also been linked to the DNA repair as a member of damage recognition complex or possibly as a regulator binding to genes with recognized repair function [9].

Several studies have linked PDIs to different types of cancer like gastric [10], prostate [11], esophageal [12], cervical [13-14], salivary gland [15], bone metastasis [16] and breast [17-18]. Another gene of this superfamily, *PDIA6*, also codifies a product with chaperone activity by inhibiting misformed protein aggregation. The protein plays a role in platelet aggregation and activation by agonists such as convulxin, collagen and thrombin. Also, it interacts with MICA (polypeptide-related sequence A of class I MHC) on the surface of tumor cells, leading to a reduction of disulfide bonds with MICA, which is needed for its release from the tumor cells [19].

PDIA6 is expressed on the surface of myeloma cells in which it has been associated with secretion of sMICA (soluble MICA) [20].

In a previous study from our group, in which we analyzed the proteome of ductal and lobular carcinomas, *PDI3* and *PDI6* showed higher expressions levels in ductal than in lobular carcinomas [21]. Considering the high prevalence of invasive ductal carcinomas (IDC) among breast tumors, the importance of PDIs in protein

folding and their relations to proper cell function, we evaluated the expression of *PDIA3* and *PDIA6* genes in patients with IDC and correlated these data with clinicopathological parameters.

Material and Methods

Sample Characterization

Forty five samples of primary invasive ductal carcinomas (IDC) were collected during surgery for partial or total mastectomies at the Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba, state of Paraná, south Brazil. Non-compromised tissues from the contralateral breast were obtained from nine patients who underwent mammoplasty for simultaneous symmetrization. These tissues were analyzed by a pathologist and considered as normal, free of cancer cells. Tumor and normal samples were conserved in an RNA stabilization solution (*RNAlater*[®], *Ambion Inc. Applied Biosystems*) immediately after surgery and were stored at 4°C prior to RNA isolation. Clinicopathological data were obtained from the pathology service of the hospital. None of the patients had any family history of hereditary breast or ovarian cancer. The average age of the patients was 57.53 ± 16.39 years and of the control group was 49.11 ± 10.43 years ($p > 0.05$). Patients had received neither chemotherapy nor radiation prior to surgery. Table 1 summarizes the clinicopathological features of the patients. The study was approved by the local Ethics Committee and an informed consent was signed by all patients.

Extraction of total RNA and retrotranscription

Total RNA was isolated using the *RNAeasy*[®] extraction kit (Qiagen), and concentrations were measured using the *NanoDrop*[®] 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc.). After, 1200ng of total RNA was retrotranscribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems).

Analysis of the genes expression

Primers (Table 2) were designed using the software PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), respecting the ideal conditions [22] for RT-qPCR. *ACTB* and *B2M* genes were used as endogenous control (reference

genes), selected through the TaqMan® Human Endogenous Control Array microfluidic card (*Applied Biosystems*). The reactions efficiencies were determined by the software Miner (<http://www.miner.ewindup.info/>). The RT-qPCR reactions were performed using the RealPlex equipment (Eppendorf). In this experiment, 15ng of cDNA, 2pmol of each primer and 5 µl of Sybr Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) were used in a total volume of 10 ul. The PCR program was as follow: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C (initial denaturation), 15 seconds at 95°C and 1 minute at the annealing temperature, repeated for 40 times (amplification). The PCR reaction was evaluated by melting curve analysis following the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Gene expression analysis was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method relative to the selected controls, corrected for efficiency of amplification as previously described [23]. The χ^2 test was used to evaluate the homogeneity of the reference genes (*ACTB* and *B2M*) data. Further, we tested the normality between groups. Student's *t* test was used when the data had a normal distribution, otherwise we applied the nonparametric Mann-Whitney (U) test. The significance of differences between the means of the expression between groups was analyzed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The significance threshold considered was 5%.

Results

Evaluation of PDIA3 and PDIA6 genes expression

$\Delta\Delta C_t$ values were obtained for each sample tested for *PDIA3* and *PDIA6* genes and normalized in relation to the reference genes *ACTB* and *B2M*. No differences were seen in C_t s values of the reference genes in tumors ($\chi^2= 1.80$, $p> 0.05$) and controls ($\chi^2= 0.52$, $p> 0.05$) and the mean value was used. After, the normalized value was compared with the expression of a calibrator (one stable sample chosen from the control group). Data are presented as fold changes in gene expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) relative to a calibrator sample [23].

Table 3 summarizes the relative expression observed. *PDIA3* gene expression in tumor tissues showed a mean gene expression 2.29 times higher than the calibrator, and in the control group this gene was less expressed, 0.92 ($p=0.001$) (Figure 1). The *PDIA6* gene expression showed no significant difference when comparing tumor and control data ($p=0.78$). Both genes presented significant higher expression level in patients with lymph node metastasis when compared with patients with no metastasis, with a FC of 2.31 and 1.57 respectively compared with values of 1.57 and 0.80 (Figure 2).

PDIA3 gene expression in tumors with histological grade III was higher (3.49 times) than the grades I and II considered together (1.97 times) (Figure 3 and Table 3). No statistically significant difference between values comparing histological grades was seen to *PDIA6*.

When the presence or absence of hormone receptors, estrogen (E) and progesterone (P) were analyzed, the only data with a statistical significance was a lower expression of *PDIA6* in the group negative for both receptors with a FC of 0.58 when compared to the control (Table 3, Figure 4).

Discussion

By proteomic analysis, we had observed an increased expression of the proteins *PDIA3* and *PDIA6* in IDC when compared with ILC tumors [21]. IDC accounts for the majority of sporadic breast tumors and despite of all the current literature about IDC the full carcinogenic process is not completely understood. In addition, PDIs have been studied extensively as an endoplasmatic reticulum chaperone involved in the quality control of new synthesized proteins but much remains to be elucidated about the role of these proteases in cancer [24]. We analyzed *PDIA3* and *PDIA6* mRNA expression in order to evaluate a possible association between their transcriptional level and the IDC development and progression. We used the tissue of the non-compromised breast to compare with IDC to assure the normality of the tissue, since the tissue adjacent to the tumor can display alterations due to changes in the microenvironment surrounding the tumor. Our results show that *PDIA3* gene has a major contribution to breast carcinogenesis when compared to *PDIA6* gene, showing differential expression between IDC and normal tissue, as well as in the majority of the tumors subgroups. *PDIA6* was

differentially expressed in two tumors subgroups (LN metastasis and HR), suggesting a role in the progression of the disease as well.

PDIs are mainly found in the ER (involved in protein folding) and are linked to cancer invasion and migration [25]. Pressinotti *et al.* (2009) [11] studied almost 1200 genes by cDNA microarray in microdissected cell populations of low- and high-risk prostate tumors and associated the high expression of *PDIA3* with malignant stages. Our results in breast cancer concur with this observation since the over expression of *PDIA3* was seen in samples from patients with lymph node metastasis and grade III tumors. Also *PDIA6* was over expressed in samples from patients with lymph node metastasis, corroborating the hypothesis that the higher expression of PDIs can be linked to neoplastic progression [26]. Khan *et al.* (2004), working with PML/RARA fusion in promyelocytic leukemia (PML), demonstrated that the resulting aberrant protein is recruited to the ER by binding PDI. This mechanism suggests a link between protein quality control and neoplastic transformation, and calls attention to new alternative therapeutic approaches to PML and other cancers by targeting these molecules (including PDI). Considering the great number of chromosome aberrations in cancer cells, PDIs must have an important role to direct the aberrant proteins to ER. PDI3 was also associated with chemoprevention, as its expression was found to be up-regulated in chemosensitive ovarian tumors when compared to chemoresistant ones [27]. Krynetskaia *et al.* (2009) [28] reported an increased resistance of lung and renal carcinomas to several chemotherapeutics agents after knocking down *PDIA3*. Finally, PDIs were detected in a proteomic search for proteins changed by resveratrol. This drug was found to decrease the association of *PDIA3* with several proteins (like TRRAP, a potent c-myc co-factor) and increase with others (like α , β and γ catenin) [29].

PDIA6 gene expression was lower in the group negative for the hormonal receptors. It's well known that estrogen signaling is a contributing factor in the regulation of breast cells proliferation and estrogen receptor targeting is a successful treatment for breast cancer. PDI has homology with the estrogen binding domain of Estrogen Receptor α and act as a molecular chaperone required for ER α -mediated gene regulation [30]. As an estrogen binding protein, PDI can modulate the level of estrogen released. Therefore, we hypothesize that the level of PDI may be associated with the absence of hormone receptors, as we saw in this small group of our sample.

Further studies with a larger number of samples need to be developed in order to confirm this hypothesis.

Conclusion

We observed higher expressions of both genes in tumor samples, when compared with normal tissue, and in samples of patients with lymph node metastasis when compared with samples of patients with no metastasis. *PDIA3* expression was also increased in grade III tumors, showing that it was altered in two important prognostic parameters. Our results suggest that PDI3 and PDI6 can be used as prognostic markers of aggressiveness. Also, it indicates that new therapeutic approaches can be developed with the use of PDIs inhibitors. More studies are necessary to highlight their functional properties and interaction with substrates and small chemical ligands.

Acknowledgements: The authors are thankful to a partial support from Fundação Araucária, CNPq and CAPES.

Conflict of Interest

All authors have no conflicts of interest.

All patients gave their informed consent to this study, which was approved by the Ethical Committee of Nossa Senhora das Graças Hospital and was registered by the CONEP (National Research Ethics Commission) number 7220-251/2003.

References

- [1] Storchova Z, Pellman D. From polyploidy and aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature Review of the Molecular Cell Biology* 2004; 5:45-54.
- [2] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14(5):381-395.
- [3] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *Cancer Journal Clinic* 2010; 1-24.
- [4] INCA. *Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde*. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em Setembro de 2012.
- [5] Wilkinson B, Gilbert HF. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1:35-44.
- [6] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 2004; 11: 372-378.
- [7] Feldman DE, Chauhan V, Koong AC. The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Molecular Cancer Research* 2005; 3: 597-605.
- [8] Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Leis lung carcinoma cells over-expressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene* 2006; 25: 917-928.
- [9] Chichiarelli S, Ferraro A, Altieri F, Eufemi M, Coppari S, Grillo C, Arcangeli V, Turano C. The stress protein ERp57/ GRP58 binds specific DNA sequences in HeLa Cells. *Journal of cellular physiology* 2007; 210:343-351.
- [10] Leys CM, Nomura S, Lafleur BJ, Ferrone S, Kaminishi M, Montgomery E, Goldenring JR. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery* 2007; 141(1): 41-50.
- [11] Pressinotti NC, Klocker H, Schafer G, Duc Luu V, Luuruschhaupt M, Kuner R, Steiner E, Poustka A, Bartsch G, Sultmann H. Differential expression of apoptotic genes *PDIA3* and *MAP3K5* distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. *Molecular Cancer* 2009; 1: 63-71.
- [12] Ayshamgul H, Ma H, Ilyar S, Zhang LW, Abulizi A. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chinese Medical Journal* 2011; 124(3): 341-6.
- [13] De Marco F, Bucaj E, Foppoli C, Fiorini A, Blarzino C, Filipi K, Giorgi A, Schininà ME, Di Domenico F, Coccia R, Butterfield DA, Perluigi M. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *Plos One* 2012; 7(3): e34366. doi: 10.1371/journal.pone.0034366.
- [14] Chung H, Cho H, Perry C, Song J, Ylaya K, Lee H, Kim JH. Downregulation of ERp57 expression is associated with poor prognosis in early-stage cervical cancer. *Biomarkers* 2013; Aug 19: doi:10.3109/1354750X.2013.827742
- [15] Müller M, Agaimy A, Zenk J, Ettl T, Iro H, Hartmann A, Seliger B, Schawarz S. The prognostic impact of human leukocyte antigen (HLA) class I antigen abnormalities in salivary gland cancer. A clinicopathological study of 288 cases. *Histopathology* 2013; 62(6): 847-59.
- [16] Santana-Codina N, Carretero R, Sanz-Pamplona R, Cabrera T, Guney E, Oliva B, Clezardin P, Olarte OE, Loza-Alvarez P, Méndez-Lucas A, Perales JC, Sierra A. A Transcriptome-proteome integrated network identifies endoplasmic

- reticulum thiol oxidoreductase (Erp57) as a hub that mediates bone metastasis. *Molecular and Cellular Proteomics* 2013; 12(8): 2111-25.
- [17] Lee HH, Lim Ca, Cheong YT, Singh M, Gam LH. Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer. *International Journal of Biological Sciences* 2012; 8(3):353-62.
- [18] Gaucci E, Altieri F, Turano C, Chichiarelli S. The protein Erp57 contributes to EGF receptor signaling and internalization in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2013; 114(11): 2461-70.
- [19] Kaiser BK, Daesong Y, I-Ting C, Segundo G, Zhenpeng D, Henning HM, Roland KS, Veronika G, Thomas S. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007; 482-487.
- [20] Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J, Neuberg D, Anderson KC, Carrasco DR, Dranov G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2008; 105:1285–1290.
- [21] Oliveira N, Gomig TB, Milioli HHZ, Urban CA, Lima RS, Cavalli IJ, Ribeiro EMSF. Comparative proteomics between ductal and lobular primary breast carcinomas. In: 57^o Congresso da Sociedade Brasileira de Genética, 2011, Águas de Lindoia. Anais do 57^o Congresso da SBG, 2011.
- [22] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55 (4):611–622.
- [23] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$} CT Method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
- [23] Lwin ZM, Yip GWC, CHEW FT, Bay BH. Downregulation of ER60 protease inhibits cellular proliferation by inducing G1/S arrest in breast cancer cells *in vitro*. *The Anatomical Record* 2012; 295:410-416.
- [24] Khan MM, Nomura T, Chiba T, Tanaka K, Yoshida H, Mori K, Ishii S. The fusion oncoprotein PML-RAR α induces endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of N-CoR and ER stress. *Journal of Biological and Chemical* 2004; 279: 11814-11824.
- [25] Lee HH, LIM CA, CHEONG YT, SINGH M, GAM LG. Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer. *International Journal of biological Sciences* 2012; 8 (3): 353-362.
- [26] Bernardini M, Lee CH, Beheshti B, *et al*. High-resolution mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*, 2005; 7:603-613.
- [27] Krynetskaia, NF.; Phadke, MS.; Jadhav, SH.; Krynetskiy, EY. Chromatin-associated proteins HMGB1/2 and PDIA3 trigger cellular response to chemotherapy-induced DNA damage. *Molecular Cancer Therapy*, 2009; 8:864-872.
- [28] Ménoret A, Drew DA, Miyamoto S, Nakanishi M, Vella AT, Rosenberg DW. Differential proteomics identifies pdia3 as a novel chemoprevention target in human colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 2012; Dec 19. doi: 10.1002/mc.21986.

[29] Xiong Y, Manevich Y, Tew KD, Townsend DM. S-Glutathionylation of Protein Disulfide Isomerase Regulates Estrogen Receptor α Stability and Function. *International Journal of Cell Biology* 2012; 2012:273549. doi: 10.1155/2012/273549.

Tables

Table 1. Sample characterization

	Age	Diagnostic	LN	G	TS	ER	PR	ERBB2
1	97	Invasive Ductal Carcinoma (luminal)	-	-	-	POS	POS	NEG
2	56	Invasive Ductal Carcinoma (NOS) associated with ductal carcinoma <i>in situ</i> comedocarcinoma with necrosis.	P	II	37	-	-	-
3	33	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	15	NEG	NEG	NEG
4	44	Bilateral Invasive Ductal Carcinoma	P	II	50	POS	POS	NEG
5	56	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	27	POS	POS	NEG (1+)
6	62	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	15	NEG	NEG	NEG
7	72	Invasive Ductal Carcinoma NOS	P	II	35	POS	POS	POS (2+)
8	67	Invasive Ductal Carcinoma NOS	P	II	5	POS	POS	NEG (1+)
9	66	Invasive Ductal Carcinoma with relapse	P	I	20	POS	POS	POS (2+)
10	67	Invasive Ductal Carcinoma NOS	P	III	50	POS	POS	NEG (1+)
11	35	Invasive Ductal Carcinoma	P	III	-	POS	POS	NEG
12	44	Invasive Ductal Carcinoma NOS	P	II	18	POS	POS	NEG
13	57	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	20	POS	POS	POS (3+)
14	72	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	24	POS	POS	NEG
15	48	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	23	NEG	NEG	NEG
16	45	Invasive Ductal Carcinoma associated with ductal carcinoma <i>in situ</i>	-	III	23	NEG	NEG	NEG
17	45	Invasive Ductal Carcinoma	A	I	5	POS	POS	POS (3+)
18	86	Invasive Ductal Carcinoma	A	III	30	POS	POS	NEG
19	83	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	8	POS	NEG	NEG
20	32	Invasive Ductal Carcinoma	P	II	25	-	-	-
21	46	Invasive Ductal Carcinoma	A	I	17	POS	POS	NEG
22	49	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	40	POS	POS	NEG
23	71	Invasive Ductal Carcinoma	A	I	10	POS	POS	NEG
24	74	Invasive Ductal Carcinoma	A	III	35	NEG	POS	NEG (2+)
25	81	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	20	POS	POS	NEG (1+)
26	73	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	32	POS	POS	NEG
27	46	Invasive Ductal Carcinoma, associated with ductal carcinoma <i>in situ</i>	P	III	40	POS	POS	NEG
28	39	Invasive Ductal Carcinoma	P	II	18	POS	POS	NEG
29	49	Multifocal Invasive Ductal Carcinoma	P	III	60	POS	POS	NEG (1+)
30	89	Invasive Ductal Carcinoma	P	III	60	NEG	NEG	POS (2+)
31	39	Invasive Ductal Carcinoma NOS associated with ductal carcinoma <i>in situ</i>	P	II	80	NEG	NEG	-
32	61	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	20	POS	POS	NEG

34	84	Invasive Ductal Carcinoma	P	III	35	NEG	NEG	POS (3+)
35	81	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	40	POS	POS	NEG
36	58	Invasive Ductal Carcinoma	P	III	17	POS	POS	NEG
37	42	Invasive Ductal Carcinoma, associated with ductal carcinoma <i>in situ</i>	A	II	32	POS	POS	NEG (+2)
38	34	Invasive Ductal Carcinoma	P	III	45	NEG	NEG	-
39	50	Invasive Ductal Carcinoma	P	II	80	NEG	NEG	NEG (+1)
40	68	Invasive Ductal Carcinoma, associated with ductal carcinoma <i>in situ</i>	A	II	10	POS	POS	NEG
41	80	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	58	POS	POS	NEG
42	54	Invasive Ductal Carcinoma		II	25	NEG	NEG	NEG
43	51	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	20	POS	POS	NEG (2+)
44	47	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	15	POS	POS	NEG (2+)
45	38	Invasive Ductal Carcinoma	A	II	14	POS	POS	NEG

Legend: LN, lymph node; G, histological grade; TS, tumor size ; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; *ERBB2*, amplification of the *ERBB2* oncogene; P, presence of metastasis; A, absence of metastasis; NOS, not otherwise specified.

Table 2 Sequence of primers

Gene	Direction	Sequence	Size (bp)	Th °C
<i>PDIA3</i>	F	AAGGCTCTGGAGAGGTTCTGC	22	66.4
	R	GGCCATCATTGCTCTCTGGGA	22	66.4
<i>PDIA6</i>	F	GGAGGTCAGTATGGTGTTTCAGGGAT	25	66.2
	R	CTGCCACCTTGGTAATCTTCTGGTC	25	66.2

Legend: bp, base pair; Th, hybridization temperature; F, forward; R, reverse.

Table 3 *PDIA3* and *PDIA6* relative expressions

Groups		<i>PDIA3</i>	N	<i>PDIA6</i>	N
IDC	FC	2.293	40	0.730	42
NT		0.923	9	0.677	9
	<i>p</i>	0.0009		0.784	
LN metastasis	FC	2.351	17	1.570	17
LN non-metastasis		1.575	18	0.808	19
	<i>P</i>	0.009		0.047	
Grade I+II	FC	1.977	30	1.067	30
Grade III		3.491	9	1.581	11
	<i>P</i>	0.024		0.157	
ER+/PR+	FC	1.570	17	1.195	30
ER-/PR-		0.08	19	0.585	8
	<i>P</i>	0.388		0.035	

Legend: IDC, invasive ductal carcinoma; NT, non-tumoral; LN, lymph node; ER+/PR+, positive estrogen and progesterone receptors; ER-/PR-, negative estrogen and progesterone receptors; FC, fold change; N, sample number.

Figures

Figure 1 - Fold Change for *PDIA3* gene of tumor and non-tumor groups

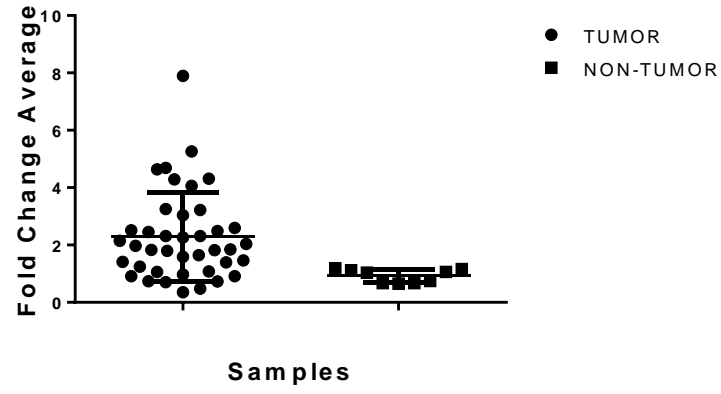


Figure 2- Fold Change for *PDIA3* (A) and *PDIA6* (B) genes of the subgroups with and without lymph node metastasis.

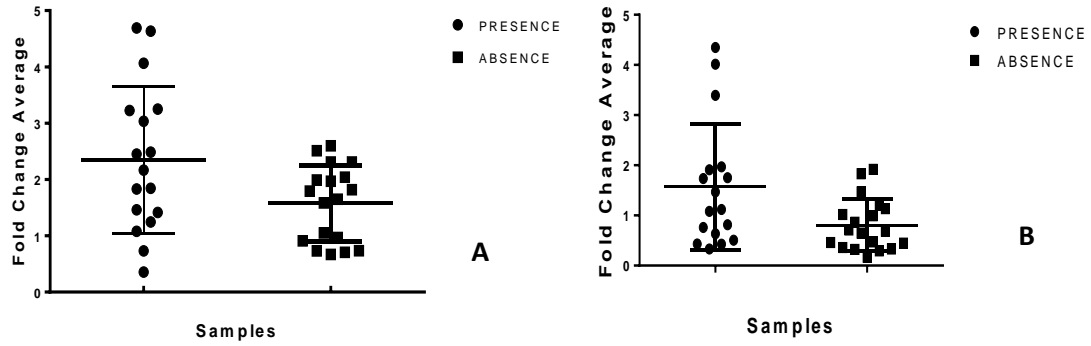


Figure 3 - Fold Change for *PDIA3* gene for subgroups of histologic grade.

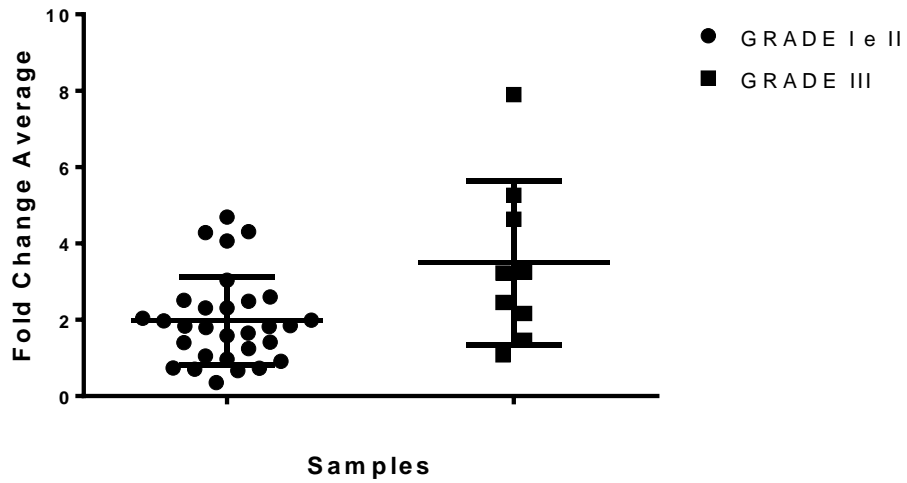
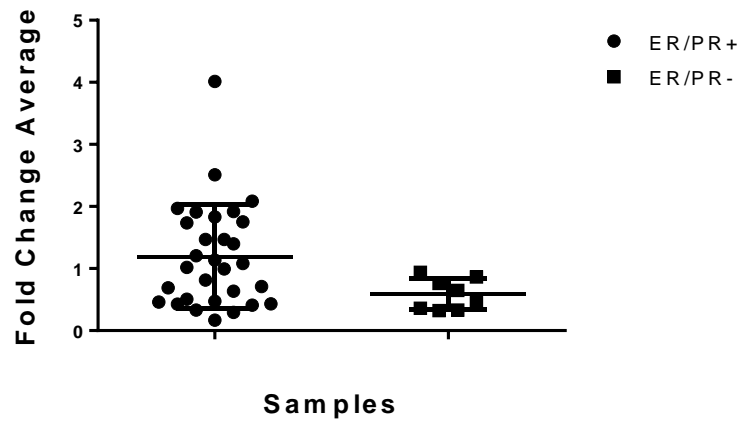


Figure 4 - Fold Change for *PDIA6* gene and hormone receptors.



5. DISCUSSÃO

Dentre os resultados da análise de expressão gênica em células do tecido mamário, foi possível verificar que há relevância dos genes *PDIA3* e *PDIA6* no processo carcinogênico. A maior contribuição provém do gene *PDIA3* o qual foi verificado como diferencialmente expresso na grande maioria dos subgrupos estudados. Além disso, é possível observar que o *PDIA6* também contribui para a progressão da doença.

Alterações na regulação desses genes podem influenciar diretamente na sobrevivência das células tumorais. A hiper-regulação dos genes de resposta ao estresse do RE pode levar a uma maior resistência a morte celular que deveria ser desencadeada por fármacos utilizados nos processos quimioterápicos. Este fato foi bem observado no estudo de Corazzari *et al.* (2007), com células de mieloma múltiplo onde o *knockdown* dos genes de resposta *PDIA3* e *ERdj5* por RNA de interferência nestas células induziram a morte celular em resposta ao Velcade (medicamento comumente utilizado em portadores desta neoplasia). Juntamente com outras chaperonas como HSP7C, HSP5A, HSPA8, HSP4A, a *PDIA3* é conhecida por aumentar a resistência à morte celular induzida por uma variedade de estímulos (GARRIDO *et al.*, 2005). A utilização de drogas associadas à supressão da expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse do RE pode ser um importante fator para o prognóstico de pacientes com câncer de mama.

O gene *PDIA3* indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tumoral e não tumoral. Esse aumento da expressão gênica observado nas amostras tumorais já foi relatado em tumores que possuíam a proteína de fusão TPMRSS2-ERG, presente em 40 a 80% dos cânceres de próstata em humanos (TOMLINS *et al.*, 2008). No estudo de Pressinoti *et al.*, (2009), juntamente com MAP3K5, *PDIA3* foi associado com estágios malignos do câncer de próstata e indicado como um provável biomarcador. O aumento da expressão de *PDIA3* pode estar relacionado ao surgimento de rearranjos cromossômicos, prevenindo ou atenuando o risco de apoptose por estresse do RE interferindo nas respostas homeostáticas, tornando possível a sobrevivência de células anormais mesmo havendo instabilidade genômica (KHAN *et al.*, 2004).

Ambos os genes demonstraram aumento significativo da expressão gênica no subgrupo presença de metástase nos linfonodos. Isso vai de acordo com a literatura onde *PDIA3* foi encontrado hiper-regulado nos estágios N1 e N2 do câncer de mama, que representam fases do desenvolvimento metastático (LEE *et al.*, 2012). Este estudo propõe que a hiper-regulação de *PDI* ocorra em paralelo com o avanço dos estágios N do câncer de mama (N0 = 51%. N1 = 69%; N2= 91%). O gene *PDIA3* também já foi encontrado hiper-regulado em cânceres gástricos (RYU *et al.*, 2003) e pancreáticos (INNOCENTI, KURAMITSU, NAKAMURA, 2009). A expressão aumentada de *PDIA6* corrobora com dados encontrados na literatura. Huergo-Zapico *et al.* (2012) observaram diferença significativa entre a expressão deste gene em células de leucemia mieloide crônica e pacientes saudáveis. Tager *et al.* (2007) também encontraram no mesmo tipo de célula uma atividade dez vezes maior de *PDI* nos pacientes do que no grupo controle.

O resultado encontrado no presente trabalho para receptores hormonais, quando analisado o gene *PDIA6*, mostrou que a significância estatística no subgrupo ER+/PR+ está de acordo com outros estudos, onde *PDI* foi reportada como proteína diferencialmente expressa em cânceres de mama (SOMIARI *et al.*, 2005). Esta associação de *PDIA6* com o processo metastático e receptores hormonais já foi observada em camundongos com câncer de mama, onde o produto gênico atuou como promotor *in vitro* e *in vivo* (GUMIREDDY *et al.*, 2007). *PDI* é também conhecida como proteína intracelular ligante de estrogênio, que acumula este hormônio nas células e aumenta a atividade de transcrição mediada pelo receptor de estrogênio (FU *et al.*, 2009). Isto reforça a hipótese de que o aumento da expressão de *PDIA6* está relacionado à presença dos receptores de estrogênio e progesterona.

O presente estudo demonstrou também a existência de significativo aumento na expressão gênica de *PDIA3* quando analisados pacientes com tumores de grau histológico III. Essa diferença acentuada em relação aos tumores de grau I e II pressupõe que haja uma importância deste gene em todo o processo do câncer. Como tumores de grau histológico III são aqueles onde o câncer está mais avançado, é possível que *PDIA3* contribua mais fortemente com a progressão da doença. O estudo realizado por Krynetskaia, Manali e Phadke (2009), mostraram que, juntamente com HMGB1 e HMGB2, *PDIA3* em células cancerosas é importante determinante da resposta celular a drogas antimetabólitos. A depleção dessas

proteínas em linhagens celulares de carcinoma humano resultou na alteração da sensibilidade celular às drogas antimetabólitos, e na diminuição da expressão dos marcadores de estresse celular. Isto ocorreu porque HMGB1 (*High Mobility Group Box 1 Protein*) e HMGB2 (*High Mobility Group Box 2 Protein*) facilitam a fosforilação de TP53, após exposição ao estresse genotóxico.

Neste trabalho, a expressão aumentada desses genes nos subgrupos analisados indica uma forte associação com a evolução do câncer de mama. O gene *PDIA3* parece contribuir desde os processos iniciais até sua expansão metastática, visto que o aumento da expressão gênica foi observado tanto nos graus histológicos I e II, com médias de *Fold Change* de 1,97 vezes mais expresso do que o grupo controle, quanto no grau histológico III, tendo sua média de 3,49 vezes mais expresso do que o grupo controle. Isto pode indicar que quanto mais avançado o estágio do câncer, mais se faz necessária a expressão de *PDIA3*. Estes resultados podem ser relacionados à interação do produto deste gene com histonas que fazem parte do nucleossomo, podendo facilitar a transcrição, além de *PDIA3*, de genes envolvidos no processo carcinogênico. Outra hipótese é que a correlação do aumento da expressão com o aumento do grau histológico seja decorrente da interação do seu produto proteico com mecanismos de reparo. Conjugando as duas hipóteses, em uma visão mais abrangente, nos estágios iniciais se faz necessário mais o papel na facilitação da transcrição gênica, e com o aumento do número de células e as inúmeras mutações que são características no desenvolvimento do câncer, as células tumorais acabariam tornando-se inviáveis pelo alto grau de instabilidade genômica. Com isso, no estado mais avançado da doença, a interação com as vias de reparo seria uma função mais conveniente, diminuindo a instabilidade celular, corrigindo algumas mutações e evitando o processo de apoptose, para continuação da evolução do câncer.

O gene *PDIA6* parece ter uma função mais ligada à agressividade do tumor mamário. As diferenças na expressão gênica foram mais significativas nos subgrupos presença de metástase e receptores hormonais. Suas interações com o processo metastático, já citadas acima, mostram que este gene pode ser sugerido com um biomarcador de prognóstico ruim em pacientes com câncer de mama. Embora não se tenha observado diferença significativa entre os subgrupos grau histológico I/II e grau III, ambos mostraram expressão aumentada deste gene com

médias de *Fold Change* de 1,06 e 1,58 vezes mais expressos do que o grupo controle, respectivamente.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho foi o primeiro em uma população brasileira a analisar a expressão dos genes *PDIA3* e *PDIA6* em pacientes com carcinoma primário de mama. Embora o tamanho amostral tenha sido pequeno, pode-se verificar resultados que indicam a relevância destes genes na evolução do câncer.

O presente trabalho propõe uma possível associação da expressão dos genes estudados com o processo carcinogênico. Devido ao grande número de células e mutações presentes na carcinogênese pode elevar os níveis de hipóxia, tornando necessária a transcrição destes genes para o controle do estresse do RE e facilitando a transcrição de outros envolvidos na progressão do câncer, ou mesmo o reparo de alguns danos no DNA que poderiam desencadear a apoptose celular, assegurando, assim, a continuidade do processo maligno.

A importância desses genes, não somente para o câncer de mama, já foi verificada em vários estudos. O presente trabalho sugere essa associação com todo o processo do câncer, onde os genes atuam de diferentes formas em diferentes estágios da evolução carcinogênica. Assim, *PDIA3* e *A6* podem ser classificados como biomarcadores de prognóstico em pacientes com carcinomas mamários, sendo necessários mais estudos para que se possa validar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

ADAMI, H.O.; DAY, N.E.; TRICHOPOULOS, D.; WILLETT, W.C. Primary and secondary prevention in the reduction of cancer morbidity and mortality. **Europe Journal Cancer**; 37, v. 8:p. 118-27, 2001.

ADELL, G.; SUN, X. F.; STAL, O.; KLINTENBERG, C.; SJODAHL, R.; NORDENSKJOLD, B. p53 status: an indicator for the effect of preoperative radiotherapy of rectal cancer. **Radiotherapy & Oncology**, 169-74, 1999.

AHN, J.; SCHATZKIN, A.; LACEY, J.R.; JV, ALBANES, D.; BALLARD-BARBASH, R.; ADAMS, K.F. *et al.* Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**; 167:2091-102, 2007.

ALLDRIDGE, L.; METHODIEVA, G.; GREENWOOD, C.; AL-JANABI, K.; THWAITES, L.; SAUVEN, P.; METHODIEV, M. Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, 1458-1469, 2008.

ALLRED, D. C.; MOHSIN, S. K.; FUQUA, S. A. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. **Endocrine-Related Cancer**, 47-61, 2001.

ALTIERI, F.; MARAS, B.; EUFEMI, M.; FERRARO, A.; TURANO, C. Purification of a 57kDa nuclear matrix protein associated with thiol:protein-disulfide oxidoreductase and phospholipase C activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 194:992–1000, 1993.

AMERICAN BREAST CANCER. **American Cancer Society**, 2010.

AMIR, E.; OOI, W.S.; SIMMONS, C.; KAHN. H.; CHRISTAKIS, M.; POPOVIC, S.; KALINA, M.; CHESNEY, A.; SINGH, G.; CLEMONS, M. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. **Clinical Oncologic Journal**, 20(10):763-8, 2008.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Princípios de PCR em tempo real**. cap 1; pag. 11-12; 2011.

ARMSTRONG, D.; BUNDY, B.; WENZEL, L.; HUANG, H.; BAERGEN, R.; LELE, S.; COPELAND, L.; WALKER, J.; BURGER, R. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**. 354, 34–43, 2006.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.

BADER, A.A.; TIO, J.; PETRU, E.; BUHNER, M.; PFANHLBERG, A.; VOLKHOLZ, H.; TULUSAN, A.H. TI breast cancer : identification of patients at low risk of axillary lymph node metastases. **Breast Cancer Research Treatment**, 76(1): 111-7. 2002.

BAI, L. e ZHU, W-G. p53: Structure, Function and Therapeutics Applications. **Journal of Cancer Molecules**, 2(4): 141-153, 2006.

BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genetic**; 16:168–74, 2000.

BAYLIN, S. B. & OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer — a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Review Cancer** 6, 107–116, 2006.

BEABER, E.F.; HOLT, V.L.; MALONE, K.E.; PORTER, P.L.; DALING, J.R.; LI, C.I. Reproductive factors, age at maximum height, and risk of three histologic types of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**; 17:3427-34 2008.

BENNET, C.F.; BALCAREK, J.M.; VARRICHIO, A.; CROOKE, S.T. Molecular cloning and complete amino-acid sequence of form-I phosphoinositide-specific C. **Nature**, 334:268-270, 1988.

BIANCHI, L.; CANTON, C.; BINI, L.; ORLANDI, R.; MÉNARD, S.; ARMINI, A.; CATTANEO, M.; PALLINI, V.; BERNARDI, L. R.; BIUNNO, I. Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction. **Proteomic**, 2433–2442, 2005.

BIRNBAUM, D; BERTUCCI, F.; GINESTIER, C.; TAGETT, R.; JACQUEMIER, J.; CHARAFE-JAUFFRET, E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**, Athens, 249-258, 2004.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G.; ROCHA, A. **Patologia**, 1472, 2006.

BOOGERD, W.; VOS, V.W.; HART, A.A.; BARIS, G. Brain metastases in breast cancer; natural history, prognostic factors and outcome. **Journal Neurooncologic** 15:165–174, 2003.

BORRESEN-DALE, A.L. *TP53* and breast cancer. **Human mutations**, 21:292-300, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informações de Saúde**. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>., 2009.

BRINK, M.; DE GOEIJ, A. F.; WEIJENBERG, M. P.; ROEMEN, G. M.; LENTJES, M. H.; PACHEN, M. M.; SMITS, K. M.; DE BRUINE, A. P.; GOLDBOEHM, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. **Carcinogenesis**, 703-710, 2003.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal Molecular Endocrinologic**, 25:169-193, 2000.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CARADEC, J.; SIRAB, N.; KEUMEUGNI, C. “Desperate house genes”: the dramatic example of hypoxia. **British Journal Cancer**, v. 102, p. 1037-1043, 2010.

CAREY, L.A.; DEES, E.C.; SAWYER, L.; GATTI, L.; MOORE, D.T.; COLLICHIO, F.; OLLILA, D.W.; SARTOR, C.I.; GRAHAM, M.L.; PEROU, C.M.: The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer sub-types. **Clinical Cancer Research**, 13(8):2329-2334. 2007.

CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer** 63(1):181-7. 1989.

CHAMBERS, A. F.; NAUMOV, G. N.; VANT YGHEM, S. A.; TUCK, A. B. Clinical targets for anti-metastasis therapy. **Breast Cancer Research**, 400 – 407, 2000.

CHIA, KS; REILLY, M; TAN, C-S; MOW, B; LEE, J; PAWITAN, Y; ADAMI, H-OM; HALL, P. Profound changes in breast cancer incidence may reflect changes into a westernized lifestyle: A comparative population-based study in Singapore and Sweden. **International Journal of Cancer**, 113(2):302–306, 2005.

CHICHIARELLI, S.; FERRARO, A.; ALTIERI, F.; EUFEMI, M.; COPPARI, S.; GRILLO, C.; ARCANGELI, V.; TURANO, C. The stress protein ERp57/ GRP58 binds specific DNA sequences in HeLa Cells. **Journal of cellular physiology**, 210:343–351, 2007.

CHICHIARELLI, S.; FERRARO, A.; GAUCCI, E.; GRILLO, C.; ALTIERI, F.; ARCANGELI, V.; TURANO, C.; EUFEMI, M. Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Vol. 494, Cap. 2, pag 178-183, 2010.

CONTESSO, G.; MOURIESSE, H.; FRIEDMAN, S. *et al.* The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. **Journal Clinical of Oncologic**, 5:1378–1386, 1987.

COPPARI, S.; ALTIERIS F.; FERRARO, A.; CHICHIARELLI, S.; EUFEMI, M.; TURANO, S. Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase ERp57 in mammalian cells. **Journal Cell Biochemistry**, 85:325–333. 2002.

CORAZZARI, M.; LOVAT, P. E.; ARMSTRONG, J.L.; FIMIA, G. M.; HILL, D. S.; BIRCH-MACHIN, M.; REDFERN, C. P.; PIACENTINI, M. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57. **British Journal of Cancer**, 1062-1071. 2007.

CUNNICK, G.H.; JIANG, W.G.; GOMEZ, K.F.; MANSEL, R.E. Lymphangiogenesis quantification using quantitative PCR and breast cancer as a model. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 288(4):1043-6. 2001.

DEANDREA, S.; TALAMINI, R.; FOSCHI, R.; MONTELLA, M.; DAL MASO, L.; FALCINI, F. *et al.* Alcohol and breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**; 17:2025-8. 2008.

DOBROVIC, A.; SIMPFENDORFER, D D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. **Cancer Research**, 57(16): p. 3347-50, 1997.

DUPONT, V.N; GENTIEN, D.; OBERKAMPF, M.; DE RYCKE, Y.; BLIN, N. A expression signature associated with metastatic cells in effusions of breast carcinoma patients. **International Journal of Cancer**. 121:1036-1046. 2007.

DYDENSBORG, A.B.; HERRING, E.; AUCLAIR, J.; TREMBLAY, E.; BEAULIEU, J.F. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. **American Journal Physiologic: Gastrointest Liver Physiologic**, v. 290, p. 1067-1074, 2006.

EUFEMI, M.; COPPARI, S.; ALTIERI, F.; GRILLO, C.; FERRARO, A.; TURANO, C. ERp57 is present in STAT3-DNA complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 323:1306–1312, 2004.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, 429:457–63, 2004.

EHRlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene**, 21:5400–13, 2002.

ENSEMBL. Disponível em:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?g=ENSG00000143870;r=2:10924138-10952880;t=ENST00000540494. Acesso em setembro de 2011.

ESTELLER, M., *et al.*. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer Research**, 59(4): p. 793-7, 1999.

ESTELLER, M., Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annual Review of Pharmacologic and Toxicologic**, 45: p. 629-56, 2005.

FARANTE, G.; ZURRIDA, S.; VIALE, G.; SAUER, F.; CAMAROTTI, D.; GOLDHRISCH, A.; VERONESI, H. Novo TNM: Classificação do câncer de mama proposta pelo Instituto Europeu de Oncologia de Milão, Itália. **Revista Brasileira de Mastologia**, 2010.

FEINBERG, A. P., OHLSSON, R. & HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetic**. 7, 21–33, 2006.

FELDMAN, D.E.; CHAUHAN, V.; KOONG, A.C. The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. **Molecular Cancer Research**, 3: 597 – 605, 2005.

FERRARI, DAVID M. E SOLING, HANS-DIETER. The protein disulphide-isomerase family: unraveling a string of folds. **Biochemical Society**, 2000.

FERRARO, A.; ALTIERI, F.; COPPARI, S.; EUFEMI, M.; CHICHIARELLI, S.; TURANO, C. Binding of the protein disulfide isomerase isoform ERp60 to the nuclear matrix-associated regions of DNA. **Journal Cell Biochemical**, 72:528–539. 2004.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, 453– 458, 2003.

FISHER, B.; BAUER, M.; WICKERHAM, D.L.; REDMOND, C.K.; FISHER, E.R.; CRUZ, A.B.; FOSTER, R.; GARDENER, B.; LERNER, H.; MARGOLESE. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. **Cancer**, 52(9):1551-7. 1983.

FONSECA, C.; SOIVER, R.; HO, V.; VANNEMAN, M.; JINUSHI, M.; RITZ, J.; NEUBERG, D.; STONE, R.; DEANGELO, D.; DRANOV, G. Protein disulfide isomerases are antibody targets during immune-mediated tumor destruction. **Blood**, 113:1681–1688. 2009.

FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E.: Quantitative RT-PCR: pit-falls and potential. **Biotechniques**, 26(1):112-5. 1999.

FU, X-M.; DAI, X.; DING, J.; ZHU, B. Pancreas-specific protein disulfide isomerase has a cell type-specific expression in various mouse tissues and is absent in human pancreatic adenocarcinoma cells: implications for its functions. **Journal of Molecular Histology** 40:189-199, 2009.

FU, J.; BIAN, L.; ZHAO, L.; DONG, Z.; GAO, X.; LUAN, H.; SUN, Y.; SONG, H. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. **Acta Biochimical and Biophysical**, v. 42, p. 568-574, 2010.

FUCITO, A.; LUCCHETTI, C.; GIORDANO, A.; ROMANO, G. Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: what are the perspectives for clinical practice? **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 565-75, 2008.

GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L.; KROEMER, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 433-442, 2005.

GE HEALTHCARE **Handbook. 2D – Electrophoresis: Principles and Methods**. Suécia: Editora Elanders Tofters, 2005.

GENTLE, A.; ANASTASOPOULOS, F.; AND MC-BRIEN, N.A. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. **BioTechniques** 31:502-508, 2001.

GODINHO, E. R.; KOCH, H. A. Rastreamento do câncer de mama: aspectos relacionados ao médico. **Radiologia Brasileira**, 91-99, 2004.

GOLDBERGER, R. F., EPSTEIN, C. J. E ANFINSEN, C. B. J. **Biologic Chemical**. 238, 628 ± 635, 1963.

GONG, C.Y.; YANG, B.; QIAN, Z.Y.; ZHAO, X.; WU, Q.J.; QI, X.R.; WANG, Y.J.; GUO, G. KAN, B.; LUO, F.; WEI, Y.Q. Improving intraperitoneal chemotherapeutic effect and preventing postsurgical adhesions simultaneously with biodegradable micelles. **Nanomedicine** 8, 963–973, 2012.

GONZÁLEZ-SANTIAGO, L.; ALFONSO, P.; SUÁREZ, Y.; NÚÑEZ, A.; GARCÍA-FERNANDEZ, L. F.; ALVAREZ, E.; MUNOZ, A.; CASAL, J. I. Proteomic Analysis of the Resistance to Aplidin Human Cancer Cells. **Journal Of Proteome Research**, 1286-1294, 2007.

GONZALEZ-ZULUETA, M., *et al.* Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Research**. 55(20): p. 4531-5, 1995.

GRAHAM, A.C. Epidemiology and prevention of breast cancer. **Cancer Epidemiologic and Biomarkers Prevention**; 14:768-72, 2005.

GRAVEN, K.; MOLVAR, C.; RONCARATI, J. S.; KLAHN, B. D.; LOWREY, S. AND FARBER, H. W. Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. **American Journal Physiologic Lung Cell. Molecular Physiologic**, 282, L996–L1003, 2002.

GREGER, V. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Human Genetic**. 83(2): p. 155-8, 1989.

GRILLO, C.; D'AMBROSIO, C.; SCALONI, A. Cooperative activity of Ref-1/APE and ERp57 in reductive activation of transcription factors. **Free Radical Biology and Medicine**, 1113– 23, 2006.

GRILLO, C.; COPPARI, S.; TURANO, C.; ALTIERI, F. The DNA-binding activity of protein disulfide isomerase ERp57 is associated with the a' domain. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 295:67 –73; 2002.

GUMIREDDY, K. In vivo selection for metastasis promoting genes in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 6696–6701, 2007.

GUO, G. G. *et al.* Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. **Journal Interferon Cytokine Research**, 22, 555–563 (2002).

GUPTA GP, MASSAGUÉ. Cancer metastasis: building a framework. **Journal of Cell**, 679 – 695, 2006.

GUPTA, G.P.; NGUYEN, D.X.; CHIANG, A.C.; BOS, P.D.; KIM, J.Y.; NADAL, C. *et al.* Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. **Nature**, 446:765–770. 2007.

HAINAUT, P. e HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first thousand mutations. **Advanced Cancer Research**; 77: 81-137. 2000.

HALL, J.M.; LEE, M.K.; NEWMAN, B.; MORROW, J.E.; ANDERSON, L.A.; HUEY, B. *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**.;250:1684-9. 1990.

HANAHAN, D. AND WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100(1): p. 57-70 . 2000.

HANAHAN, D. AND WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5): p. 646-74.2011.

HANRIOT, R.M. Radioterapia em câncer de mama – aliada ou vilã? **Oncologia**, Março de 2011.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. 6:986-994, 1996.

HERMAN, J.G., *et al.* Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. **Cancer Research** , 55(20): p. 4525-30, 1995.

HERMAN, J.G., *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proceeding of the National Academy of Science**, U S A. 95(12): p. 6870-5,1998.

HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **New England Journal of Medicine**. 349:2042–54, 2003.

HETZ, C.; RUSSELAKIS-CARNEIRO, M.; MAUNDRELL, K.; CASTILLA, J.; SOTO, C. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. **The EMBO Journal**, 5435–5445, 2003.

HIGUCHI, R.C.; FOCKLER, G.; DOLLINGER, R. WATSON. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY)** 11:1026-1030, 1993.

HIGUCHI, T.; WATANABE, Y.; WAGA, I. Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF- κ B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 46-52, 2004.

HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS. Acesso em 11/01/2013. Disponível em: <http://www.hospitalsiriolibanes.org.br/hospital/especialidades/mastologia/informacoes-sobre-tratamento-cancer-mama/Paginas/cirurgia.aspx>.

HORNBERG, J.J. Cancer: a systems biology disease. **Biosystems**, v.83, n.2-3, p.81–90, 2006.

HUERGO-ZAPICO, L.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, A.P.; CONTESTI, J.; GONZALEZ, E.; LÓPEZ-SOTO, A.; FERNANDEZ-GUIZAN, A.; ACEBES-HUERTA, A.; DE LOS TOYOS, J.R.; LOPEZ-LARREA, C.; GROH, V.; SPIES, T.; GONZALEZ, S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. **Cancer Immunologic Immunother**, 61:1201-1210. 2012.

HUO, D.; ADEBAMOWO, C.A.; OGUNDIRAN, T.O.; AKANG, E.E.; CAMPBELL, O.; ADENIPEKUN, A. *et al.* Parity and breastfeeding are protective against breast cancer in Nigerian women. **British Journal of Cancer**, 98:992-6, 2008.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, working group. Lyon France: IARC Press; **Handbook of Cancer Prevention**, Vol. 7. 2002.

IMAIZUMI, K. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. **Biochemical et Biophysical Acta**, 85–96, 2001.

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde. Acesso em Setembro de 2012. Disponível em: <http://www.inca.org.br>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Acesso em 23 de Janeiro de 2013. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54#.

INNOCENTI, F.; KURAMITSU, Y.; NAKAMURA, K. Proteomic Analysis in Cancer Patients. In *Genomics and Pharmacogenomics in Anti-cancer Drug Development and Clinical Response*. **Humana Press**. 33-45, 2009.

INUMARU, L.E.; SILVEIRA, E.P.; NAVES, M.M.V. Fatores de risco e proteção para o câncer de mama: uma revisão sistemática. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 27 (7): 1259-1270, jul, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). Controle do câncer de mama. Documento de consenso. Rio de Janeiro: **INCA**, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer**; 2009.

JAYARAMAN, L.; MURTHY, K. G.; ZHU, C.; CURRAN, T.; XANTHOUDAKIS, S.; PRIVES, C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. **Genes Development**; 558–570, 1997.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer Statistics, 2010. **Cancer Journal Clinical**, 1-24, 2010.

JINUSHI, M.; VANNEMAN, M.; MUNSHI, N.C.; TAI, Y.T.; PRABHALA, R.H.; RITZ, J.; NEUBERG, D.; ANDERSON, K.C.; CARRASCO, D.R.; DRANOV, G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. **Proceedings of the National Academy Science USA** 105:1285–1290. 2008.

JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetics comes of age. **National Genetic**; 21:163–7, 1999.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **National Review Genetic**; 3:415–28. 2002.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The epigenomics of cancer. **Cell**; 128 (4): p.683-92. 2007.

KAISER, B. K.; DAESONG, Y.; I-TING, C; SEGUNDO, G.; ZHENPENG, D.; HENNING, H. M.; ROLAND, K. S.; VERONIKA, G.; THOMAS, S. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. **Nature**, 482-487; 2007.

KANE, M.F., *et al.* Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. **Cancer Research**, 57(5): p. 808-11. 1997.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast Disease**. 26: 75-85. 2007.

KHAN, M. M.; NOMURA, T.; CHIBA, T.; TANAKA, K.; YOSHIDA, H.; MORI, K.; ISHII, S. The fusion oncoprotein PML-RARalpha induces endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of N-CoR and ER stress. **Journal Biologic Chemical** 279: 11814 – 11824, 2004.

KHEIRELSEID, E. A. H.; CHANG, K. H.; NEWELL, J.; KERIN, M. J.; MILLER, N. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. **BMC Molecular Biology**, v. 11, n. 12, 2010.

KLEER, C. G. *et al.* *EZH2* is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. **Proceedings of the National Academy Science**. USA 100, 11606–11611, 2003.

KLIGERMAN J. O câncer como um indicador de saúde no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 1999.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl Acad. Sci.** USA 68, 820–823, 1971.

KNUDSON, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **National Review Cancer**; 1:157–62. 2001.

KOK, J. B.; ROELOFS, R.W.; GIESENDORF, B.A. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. **Laboratory Investigation**, v. 85, p. 154-159, 2005.

KOSHIKAWA, N.; MAEJIMA, C.; MIYAZAKI, K.; NAKAGAWARA, A.; TAKENAGA, K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells over-expressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. **Oncogene** 25: 917 – 928, 2006.

KRYNETSKAIA, N. F.; MANALI, S.; PHADKE, S. H. Chromatin-associated proteins HMGB1/2 and PDIA3 trigger cellular response to chemotherapy-induced DNA damage. **Molecular Cancer Therapeutic**, 864-872, 2009.

KRYNETSKI, E. Y.; KRYNETSKAIA, N. F.; BIANCHI, M. E.; EVANS, W. E. A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, E Rp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. **Cancer Research**. 63: 100–106; 2003.

LAI, R.; DANG, C.; MALKIN, M; ABREY, L. The risk of central nervous system metastases after trastuzumab therapy in patients with breast carcinoma. **Cancer**. 101:810-816. 2004.

LIU, W. E SAINT, D.A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. **Analytical Biochemistry**. 302:52-59. 2002.

LIVAK, K.J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods** 25:402-408. 2001.

LEE, Y.T. Breast carcinoma: Pattern of metastasis at autopsy. **Journal Surgery of Oncologic** 23:175-180, 2003.

LEE, H-H.; LIM, C-A.; CHEONG, Y-T.; SINGH, M.; GAM, L-G. Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer. **International Journal of biological Sciences**. 8 (3): 353-362. 2012.

LEYS, C.M.; NOMURA, S; LAFLEUR, B.J.; FERRONE, S.; KAMINISHI, M.; MONTGOMERY, E.; GOLDENRING, J.R. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. **Surgery**, 41-50, 2007.

LIANG, P.; MACRAE, T. H. Molecular chaperones and the cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, 1431-1440, 1997.

LINDQUIST, J. A.; HAMMERLING, G. J.; TROWSDALE, J. ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. **FASEB Journal**, 1448-50, 2001.

MA, Y.; HEDERSHOT, L. M. The role of the unfolded protein response in tumour development: Friend or Foe? **Nature Reviews**, 966-977, 2004.

MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILA, T.; AND PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, 149:269-277, 2003.

MARKUS, M.; BENEZRA, R. Two isoforms of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism. **Journal of Biologic Chemistry**, 274:1040–1049; 1999.

MASSAGUÉ, J. Sorting out breast cancer gene signatures. **New England Journal of Medicine**, 294 – 297, 2007.

MATHEW, A.; GAJALAKSHMI, V.; RAJAN, B.; KANIMOZHI, V.; BRENNAN, P.; MATHEW, B.S. *et al.* Anthropometric factors and breast cancer risk among urban and rural women in South India: a multicentric case-control study. **British Journal of Cancer** ; 99:207-13. 2008.

MBEUNKUI, F.; FODSTAD, O.; PANNELL, L. K. J. Secretory protein enrichment and analysis: an optimized approach applied on cancer cell lines using 2D LC-MS/MS. **Proteome Research**, 899, 2006.

MCNEILL, R.E.; MILLER, N.; KERIN, M.J. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. **BMC Molecular Biology**, v. 8, n. 107, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atlas de Mortalidade por Câncer no Brasil 1980-2010. **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro; 2012.

MINN, A.J.; GUPTA, G.P.; PADUA, D.; BOS, P.; NGUYEN, D.X.; NUYTEN, D. *et al.* Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. **Proceedings National Academy Science USA** 104:6740–6745. 2007.

MORSE, D.L.; CARROLL, D.; WEBERG, L.; BORGSTROM, M.C.; RANGER-MOORE, J.; GILLIES, R.J. Determining suitable internal standards for mRNA

quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 342, p. 69–77, 2005.

MULLER, P.Y.; JANOVJAK, H.; MISEREZ, A.R. AND DOBBIE, Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. **Biological Techniques** 32:1372-1379. 2002.

MURTHY, M.S.R.; PANDE, S.V. A stress-regulated protein, GRP58, a member of thioredoxin superfamily, is a carnitine palmitoyltransferase isoenzyme. **Biochemical Journal**. 304:31-34, 1994.

MYOISHI, M.; HAO, H.; MINAMINO, T.; WATANABE, K.; NISHIHARA, K.; HATAKEYAMA, K.; ASADA, Y.; OKADA, K.; ISHIBASHI-UEDA, H.; GABBIANI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; MOCHIZUKI, N. *et al.* Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. **Circulation** 116, 1226–1233, 2007.

NANDI, S.; GUZMAN, R. C.; YANG, J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3650-3657, 1995.

NGUYEN, D. X. E MASSAGUÉ, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nature Reviews**, 341-352, 2007.

NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. **Cell Signal**, 381-395, 2002.

NIELSEN, T.O.; HSU, F.D.; JENSEN, K.; CHEANG, M.; KARACA, G.; HU, Z.; HERNAN-DEZ-BOUSSARD, T.; LIVASY, C.; COWAN, D.; DRESSLER, L. *et al.*: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 10(16):5367-5374. 2004.

NKONDJOCK, A.; GHADIRIAN, P. Risk factors and risk reduction of breast cancer. **Medicine Science**, 175-80, 2005.

NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biologic Medical**. 31. pp. 1287 – 1312; 2000.

OLIVEIRA, N. C. S. **Análise proteômica comparativa do carcinoma mamário lobular e ductal.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética. UFPR. 2011. Orientador: Enilze Maria de S. F. Ribeiro.

OLIVEIRA, S. F. V. **Análise da expressão de genes de reparo da via *FANC-BRCA* em carcinomas primários de mama.** Relatório de dois anos do curso de doutorado. 5.2;31; 2011.

PALMER, S.; WIEGAND, A.P.; MALDARELLI, F.; BAZMI, H.; MICAN, J.M.; POLIS, M.; DEWAR, R.L.; PLANTA, A. New real-time reverse transcriptase initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. **Journal Clinical Microbiologic.** 41:4531-4536, 2003.

PANARETAKIS, T.; *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. **EMBO Journal.** 28(5): p. 578-90, 2009.

PARKER, J. S.; MICHAEL, M.; MAGGIE, C. U. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology,** 1160-1167, 2009.

PATEL, R.R.; MEHTA, M.P. Targeted Therapy for Brain Metastases: Improving the Therapeutic Ratio. **Clinical Cancer Research;** 13 (6):1675–1683. 10.1158/1078-0432.ccr-06-2489, 2007.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C. A.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature;** 747 – 752, 2000.

PETO, J. e HOULSTON, R.S. Genetics and common cancer. **Europa Journal Cancer;** 37: S88-S96. 2001.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation,** 3155-3163, 2007.

PORTER, P. Westernizing women's risks? Breast cancer in low income countries. **New England Journal Medicine;** 358(3):213–216, 2008.

PRESSINOTTI, N.C.; KLOCKER, H.; SCHAFFER, G.; DUC LUU, V.; LUURUSCHHAUPT, M.; KUNER, R.; STEINER, E.; POUSTKA, A.; BARTSCH, G.;

SULTMANN, H. Differential expression of apoptotic genes *PDIA3* and *MAP3K5* distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. **Molecular Cancer**, 2009.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 856-862, 2004.

RAO, R.V.; ELLERBY, H.M.; BREDESEN, D.E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. **Cell Death and Differentiation** 11: 372 – 38, 2004.

RHEE, J.; HAN, S.-W.; OH, D.-Y.; KIM, J.H.; IM, S.-A.I.; HAN, W.; PARK, I.A.; NOH, D.-Y.; BANG, Y.-J.; KIM, T.-Y. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer. **BMC Cancer**, 8:370, 2008.

RICCI, M.D.; JUNQUEIRA, P.A.A. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 54(3): 189-201 2008.

RIETJENS, M. e URBAN, C.A. Chirurgia della mammella: Estetica e Ricostruttiva. **Piccin Nuova Libreria**, vol.1, cap. 4, pag 343-344, 2009.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, 1503, 2006.

RUBIE, C.; KEMPF, K.; HANS, J. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. **Molecular Cell Probes**, v. 19, p.101-109, 2005.

RYU, J.W.; KIM, H.J.; LEE, Y.S.; MYONG, N.H.; HWANG, C.H.; LEE G.S.; YOM, H.C. The Proteomics Approach to Find Biomarkers in Gastric Cancer. **Journal Korean Medicine Science**. 18:505-509, 2003.

SCHRODER, M. e KAUFMAN, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review Biochemical**. 74:739-89, 2005.

SCHMIDT, M.E.; STEINDORF, K.; MUTSCHELKNAUSS, E.; SLANGER, T.; KROPP, S.; OBI, N. *et al.* Physical activity and postmenopausal breast cancer: effect modification by breast cancer subtypes and effective periods in life. **Cancer Epidemiologic Biomarkers Previation**; 17:3402-10. 2008.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A.; MILLS, A.G.; GORN, V.; SINGER, M.J.; AND REED, M.W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Analytical Biochemistry**. 285:194-204, 2000.

SIMMONS, C.; MILLER, N.; GEDDIE, W.; GIANFELICE, D.; OLDFIELD, M.; DRANITSARIS, G.; CLEMONS, M.J. Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases? **Annual Oncologic**, 20(9) :1499-504, 2009.

SINGLETTARY, S.E.; ALLRED, C.; ASHLEY, P., *et al.* Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. **Journal Clinical Oncologic**, 20:3628–3636, 2002.

SHINOZAKI, M.; HOON, D. S. B.; GIULIANO, A. E.; HANSEN, N. M.; WANG, H. J.; TURNER, R.; TABACK, B. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clinical Cancer Research**, 2156-2162, 2005.

SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S, FUCHS H, PATON V, BAJAMONDE A, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic cancer that overexpresses HER2. **New England Journal Medical.**;344(11): 783-92, 2001.

SOMIARI, R.I.; SOMIARI, S.; RUSSELL, S.; SHRIVER, C.D. Proteomics of breast carcinoma. **Journal of Chromatography**, 815:215-225, 2005.

SORBY, L.A. ; ANDERSEN, S.N. ; BUKHOLM, I.R. ; JACOBSEN, M.B. Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.**, v. 29, p. 144, 2010.

SORLIE, T. ; PEROU, C.M. ; TIBSHIRANI, R. ; AAS, T. ; GEISLER, S. ; JOHNSEN, H. ; HASTIE, T. ; EISEN, M.B. ; RIJN, M. ; VAN DE JEFFREY, S.S., *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings National Academy Science USA**, 98(19):10869-10874. 2001.

SOUAZE, F. ; NTODOU-THOME, A. ; TRAN, C.Y. ; ROSTENE, W. ; AND P. FORGEZ. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. **BioTechniques** 21:280-285. 1996.

SPRAGUE, B.L. ; TRENTAM-DIETZ, A. ; NEWCOMB, P.A. ; TITUS-ERNSTOFF, L. ; HAMPTON, J.M. ; EGAN, K.M. Lifetime and occupational physical activity and risk of in situ and invasive breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention** ; 16:236-43. 2007.

SRIVASTAVA, S.P.; CHEN, N.Q.; LIU, Y.X.; HOLTZMAN, J.L. Purification and characterization of a new isoenzyme of thiol : protein-disulfide oxidoreductase from rat hepatic microsomes. **Journal Biologic Chemistry**. 266 :20337-20344. 1991.

STEWART, B.; KLEIGUES, PE. Lyon France: IARC Press; **World Cancer Report**, 2003.

STORCHOVA, Z; PELLMAN, D. From polyploidy and aneuploidy, genome instability and cancer. **Nature Review of the Molecular Cell Biology**. 45-54, 2004.

STUEBE, A.M.; WILLETT, W.C.; XUE, F.; MICHELS, K.B. Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. **Archives of Internation Medicine**; 169:1364-71, 2009.

TAGER, M.; KRONING, H.; THIEL, U.; ANSORGE, S. Membrane bound protein disulphide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. **Experimental Hematology** 25:601–607. 2007.

TAVARES, J. S. C.; TRAD, L. A. B. Estratégias de enfrentamento do câncer de mama: um estudo de caso com famílias de mulheres mastectomizadas. **Ciências e Saúde Coletiva**. 1349-1358, 2010.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, p. S1–S5, 2010.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 2012.

TIAN, F.; ZHOU, X.; WIKSTRO, M, J.; KARLSSON, H.; SJO, LAND, H.; GAN, L. M.; BORE, N, J.; AND AKYU, REK, L. M. Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells in mice exposed to chronic hypoxia: A stimulatory role in angiogenesis. **American Journal Physiologic Heart Circulation**, 297, 1078–1086. 2009.

TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M.W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. **Nucleic Acids Research**. 31:e122. 2003.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIÈRE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; LE BOURHIS, X. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. **Molecular and Cellular Proteomics**, 1239-1247, 2007.

TOMLINS, S.A.; LAXMAN, B.; VARAMBALLY, S.; CAO, X.; YU, J.; HELGESON, B.E.; CAO, Q.; PRENSNER, JR.; RUBIN, M.A.; SHAH, R.B.; *et al.*: Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. **Neoplasia**, 10:177-188. 2008.

UNIPROTKB/ SWISS-PROT. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PDIA3>. Acesso em setembro de 2011.

URADE, R.; KITO, M. Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER-60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum. **FEBS Lett**. 312: 83-86, 1992.

VAN DE WOUW, A. J., JANSEN, R. L., SPEEL, E. J. & HILLEN, H. F. **The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review**. Annual Oncologic. 14, 191–6 2003.

VAN 'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y.D.; HART, A. A.; MAO, M.; *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**; 530 – 536. 2002.

VERONESI, U.; GALIMBERTI, V.; PAGANELLI, G.; MAISONNEUVE, P.; VIALE, G.; ORECHIA, LUINI, A.; INTRA, M.; VERONESI, P.; CALDARELLA, P.; RENNE, G.; ROTMENTSZ, N.; SANGALLI, C.; LIMA, L.B.; TUILLI, M.; ZURRIBA, S. Axillary metastases in breast cancer patients with negative sentinel nodes: A follow-up of 3548 cases. **Breast Diseases: A year book quarterly**, vol 21, cap 1, pag 59-60, 2009.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling Breast Cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, 659-72, 2007.

VONA-DONIS, L.; ROSE, D.P. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. **Elsevier**, vol 20, cap 3. Pg 193-201, 2009.

XIA, M.; SHERLOCK, J.; HEGERICH, P.; YOU, X.; LEE, K.; WALWORTH, C.; SPIER, E. DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data. **IMECS – Hong Kong**, 2010.

ZHANG, S.M.; LEE, I.M.; MANSON, J.E.; COOK, N.R.; WILLETT, W.C.; BURING, J.E. Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. **American Journal Epidemiologic**; 165:667-76. 2007.

WANG, T. E BROWN, M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. **Anaytical Biochemistry**. 269:198-201. 1999.

WEIDNER, N.; SEMPLE, J.P.; WELCH, W.R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. **New England Journal Medicine** 324(1):1-8. 1991.

WEIGELT, B., PETERSE, J. L. & VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Review. Cancer** 5, 591–602, 2005.

WEIL, R.J.; PALMIERI, D.C.; BRONDER, J.L.; STARK, A.M.; STEEG, P.S. Breast cancer metastasis to the central nervous systems. **American Journal Pathologic**. 167:913-920. 2005.

WILKING, U.; SKOOG, L.; ELMBERGER, G.; WILKING, N.; BERGH, J. HER2 gene amplification (HER2) and hormone receptor expression (ER/PR) in early (EBC) and metastatic breast cancer (MBC) in the same patients. **Journal Clinical Oncologic**, 25(18 Suppl):1023, 2007.

WOOD, W.C.M.H.; SOLIN, L.J.; OLOPADE, O.I.: Malignant tumors of the breast. 7th edition. **Philadelphia: Lippincott Wiliams & Wilkins**; 2005.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**. ;378:789-92. 1995.

WORLD BREAST CANCER REPORT. Disponível em: <http://www.auntminnieeurope.com/index.aspx?sec=sup&sub=wom&pag=dis&ItemID=606885>. Acesso realizado em 2013.

WORLD CANCER RESEARCH FUND, AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. **Washington DC: American Institute for Cancer Research; 2008.**

WU, W. *et al.* Nuclear translocation of the 1,25D3-MARRS (membrane associated rapid response to steroids) receptor protein and NFkappaB in differentiating NB4 leukemia cells. **Experimental Cell Research** 316, 1101–1108, 2010.

ZHANG, S.M.; LEE, I.M.; MANSON, J.E.; COOK, N.R.; WILLETT, W.C.; BURING, J.E. Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. **American Journal Epidemiologic**; 165:667-76. 2007.

APÊNDICE I

MATERIAL E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de tecidos mamários (tumoral e não tumoral) foram coletadas no momento da cirurgia no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) e do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná. Para a coleta do tecido não tumoral, é respeitada a margem de segurança (cinco centímetros, determinada pelo cirurgião responsável) e, posteriormente, a ausência de células neoplásicas é confirmada por um patologista.

O projeto foi aprovado por Comitê de Ética (Registro CONEP 7220) e um consentimento livre e esclarecido foi assinado pelas pacientes (ANEXO I). Os dados clínico-histopatológicos são constantemente atualizados pelos clínicos responsáveis, que permitem o acesso para a realização das análises propostas.

Após a coleta da amostra, o material foi mantido em tubos contendo *RNAlater*® (*Ambion Inc. Applied Biosystems*) para garantir a preservação do RNA até o momento da sua extração.

Os dados referentes a cada amostra foram registrados no banco de dados do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, seguido do processamento manual para remoção do tecido não tumoral (exclusivo para amostras tumorais), tecido adiposo, tecido estromal e vasos sanguíneos viabilizando a amostra para o estudo. Nesta etapa o material fica sobre placas de Petri descartáveis, e a remoção de regiões não utilizáveis é realizada com pinças e tesouras devidamente esterilizadas. Para estocagem do material processado, foram utilizados tubos do tipo *Eppendorf* que abrigaram os fragmentos de tumor em freezer à -80° C até o momento da extração de RNA.

O grupo amostral do trabalho está mostrado no QUADRO 1 abaixo juntamente com as características apresentadas por cada amostra. Neste quadro

encontram-se as informações necessárias para a análise estatística, pois os subgrupos que foram comparados neste trabalho dependem destas informações.

	IDADE	DIAGNÓSTICO	L	G	T	ER	PR	ERBB2
1	97	Carcinoma Ductal Invasor (luminal)	-	-	-	POS	POS	NEG
2	56	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a carcinoma ductal <i>in situ</i> comedocarcinoma, com necrose.	P	II	37	-	-	-
3	33	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	15	NEG	NEG	NEG
4	44	Carcinoma Ductal Invasor Bilateral	P	II	50	POS	POS	NEG
5	56	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Intraductal sólido e cibriforme	A	II	27	POS	POS	NEG (1+)
6	62	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	15	NEG	NEG	NEG
7	72	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	35	POS	POS	POS (2+)
8	67	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	5	POS	POS	NEG (1+)
9	66	Carcinoma Ductal Invasor com Recidiva	P	I	20	POS	POS	POS (2+)
10	67	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	P	III	50	POS	POS	NEG (1+)
11	35	Carcinoma Ductal Medular	P	III	-	POS	POS	NEG
12	44	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	18	POS	POS	NEG
13	57	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	20	POS	POS	POS (3+)
14	72	Carcinoma Ductal Invasor associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	A	II	24	POS	POS	NEG
15	48	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	23	NEG	NEG	NEG
16	45	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	-	III	23	NEG	NEG	NEG
17	45	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	5	POS	POS	POS (3+)
18	86	Carcinoma Ductal Invasor associado à CDIS padrão sólido	A	III	30	POS	POS	NEG
19	83	Carcinoma Ductal Invasor Apócrino, Carcinoma " <i>in situ</i> " tipo comedo e cibriforme.	A	II	8	POS	NEG	NEG
20	32	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	25	-	-	-
21	46	Carcinoma Ductal	A	I	17	POS	POS	NEG
22	49	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	40	POS	POS	NEG
23	71	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	10	POS	POS	NEG
24	74	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	35	NEG	POS	NEG (2+)
25	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	20	POS	POS	NEG (1+)
26	73	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	32	POS	POS	NEG
27	46	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Ductal <i>in situ</i> sólido cibriforme.	P	III	40	POS	POS	NEG
28	39	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	18	POS	POS	NEG

29	49	Carcinoma Mamário Invasor Multifocal, a maior lesão sendo CDI associado a carcinoma micropapilar invasor.	P	III	60	POS	POS	NEG (1+)
30	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	60	NEG	NEG	POS (2+)
31	39	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	P	II	80	NEG	NEG	-
32	61	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	20	POS	POS	NEG
34	84	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	35	NEG	NEG	POS (3+)
35	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	40	POS	POS	NEG
36	58	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	17	POS	POS	NEG
37	42	Carcinoma Ductal Invasor; associado a carcinoma <i>in situ</i> cribriforme	A	II	32	POS	POS	NEG (+2)
38	34	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	45	NEG	NEG	-
39	50	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	80	NEG	NEG	NEG (+1)
40	68	Carcinoma Ductal, associado a Ca <i>in situ</i> tipo sólido e cribriforme	A	II	10	POS	POS	NEG
41	80	Carcinoma Ductal Invasor, com Ca <i>in situ</i> associado, comedo e papilífero	A	II	58	POS	POS	NEG
42	54	Carcinoma Ductal Invasor		II	25	NEG	NEG	NEG
43	51	Carcinoma Ductal misto padrão Ducto Lobular Invasor	A	II	20	POS	POS	NEG (2+)
44	47	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	15	POS	POS	NEG (2+)
45	38	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	14	POS	POS	NEG

QUADRO 1: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.

FONTE: O autor, 2012.

LEGENDA: **IDADE**. Idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **SOE**, sem outra especificação; **L**, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; **P**, presença; **A**, ausência; **G**, grau do tumor classificado em I, II ou III; **T**, tamanho do tumor em mm, **ER**, status do receptor de estrogênio, **PR**, status do receptor de progesterona, **ERBB2**, amplificação do oncogene *ERBB2*, **POS**, positivo, **NEG**, negativo..

EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E RETROTRANSCRIÇÃO

A extração do RNA total das amostras tumorais e não tumorais foi realizada com o kit de extração *RNAeasy*[®] (*Qiagen*). Em torno de 0,03 g de tecido tumoral e 0,1 g do tecido não tumoral de cada amostra foram utilizados e a extração ocorreu conforme as recomendações do fabricante.

A verificação da integridade do material foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2,0 %, utilizando-se em torno de 200 ng do RNA extraído. Posteriormente, o material foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta sendo documentado no sistema de captação de imagens pelo *software* “Dig doc-it”. Quando o RNA estava íntegro, apresentou duas bandas visíveis, referentes aos RNAs ribossomais (rRNA) 28S e 18S, presentes em células de eucariotos.

O equipamento *Nanodrop*[®] 2000 foi utilizado para determinar as concentrações de RNAs de cada amostra, e a partir delas foram preparadas soluções de trabalho a 120 ng/ μ L. Posteriormente, ocorreu a retrotranscrição de 1200 ng de RNA para 20 μ L de volume final (60 ng/ μ L) para síntese de DNA complementar (cDNA) com a utilização do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Ao final, foram adicionados 140 μ L de água ultra-pura à reação de retrotranscrição, obtendo-se uma concentração final de 7,5 ng/ μ L. O exemplo da padronização da reação de retrotranscrição está no quadro abaixo (QUADRO 2).

REAGENTES	VOLUMES	3 REAÇÕES
Água	4,2 µL	12,6 µL
Tampão	2,0 µL	6 µL
Iniciadores randômicos	2,0 µL	6 µL
dNTPs	0,8 µL	2,4 µL
Enzimas de Retrotranscrição	1,0 µL	3,0 µL
Amostra de RNA (120 ng/ µL)	10,0 µL	
Volume final	20,0 µL	

QUADRO 2: PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RETROTRANSCRIÇÃO PARA TRÊS REAÇÕES.

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: **dNTPs**: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (Adenina, Citosina, Guanina e Timina); **µL**: microlitro; **ng**: nanograma.

SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

É importante validar os genes de referência em cada sistema experimental, a fim de aumentar a confiabilidade nas diferenças de expressão que são detectadas (SORBY *et al.*, 2010). Estudos de Radonic *et al.* (2004); KOK, ROELOFS e GLESENDORF (2005) e RUBIE, KEMPF e HANS (2005) tentaram descrever genes de referência estáveis universalmente para diversos tipos de tumores. Entretanto, trabalhos recentes (CARADEC; SIRAB; KEUMEUGNI, 2010) mostram que genes estáveis em um tipo tumoral não necessariamente serão estáveis em outro tipo. Estas variações são observadas inclusive entre experimentos diferentes para um mesmo tipo tumoral (DYDENSBORG *et al.*, 2006; KHEIRELSEID *et al.*, 2010). Portanto, os genes de referência devem ser validados e selecionados em cada experimento para cada tipo de tecido.

Neste estudo foi utilizado o cartão microfluídico de 384 poços *Taq Man Low Density Endogenous Control Panel* (TLDA – *Taq Man Low Density Array*) (*Applied Biosystems*). Este cartão contém ensaios de expressão em triplicatas para 16 genes de referência comumente utilizados (QUADRO 03), e comporta cDNA de 8 amostras, juntamente com *Taq Man Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*) em um volume final de 100 µl. A leitura foi realizada no aparelho da *Applied Biosystems 7900HT Fast Real time PCR System*, utilizando o seguinte programa de PCR: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 94 °C e 40 ciclos de 30 segundos a 97 °C, seguidos de 1 minuto a 60 °C. Foram utilizadas cerca de 500 ng de cDNA de 5 amostras de tumores de mama e 3 amostras de tecido não tumoral da mama (contralateral). A placa foi analisada utilizando os softwares *SDS v2.3 for the 7900HT Fast Real Time PCR System* e *RQ Manager v1.2* (*Applied Biosystems*).

Os resultados foram analisados no software *DataAssist*[®] v. 3.0 (Disponível em http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/DATAASSIST_SOFTWARE_LOGIN, e estão representados na FIGURA 6. Os genes candidatos mais estáveis apresentam os menores scores, sendo eles *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB*.

Nome do Gene	Símbolo	ID	Tamanho (pb)
18S Ribosomal RNA	18S	Hs99999901_s1	187
Phosphoglycerate Kinase-1	PGK1	Hs99999906_m1	75
B-Actin	ACTB	Hs99999903_m1	171
Polymerase (RNA) II polypeptide A	POLR2A	Hs00172187_m1	61
Beta-2-microglobulin	B2M	Hs99999907_m1	75
Peptidyl-prolyl isomerase/ciclophylin A	PPIA	Hs99999904_m1	98
Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1	122
Acidic ribosomal phosphoprotein P0	RPLP0	Hs99999902_m1	105
B-Glucuronidase	GUSB	Hs99999908_m1	81
Transcription factor IID, TATA box binding protein	TBP	Hs99999910_m1	127
Hydromethylbilane synthase	HMBS	Hs00609297_m1	64
Transferrin receptor (p90, CD71)	TFRC	Hs99999911_m1	105
Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase 1	HPRT1	Hs99999909_m1	100
Ubiquitin C	UBC	Hs00824723_m1	71
Importin 8	IPO8	Hs00183533_m1	71
Tyrosine 3 monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	Hs00237047_m1	70

QUADRO 3 – GENES DE REFERÊNCIA CANDIDATOS INCLUÍDOS NO CARTÃO TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL.

FONTE: Oliveira, S.V.F. (2011).

LEGENDA: **ID**, identificação; **pb**, pares de bases.

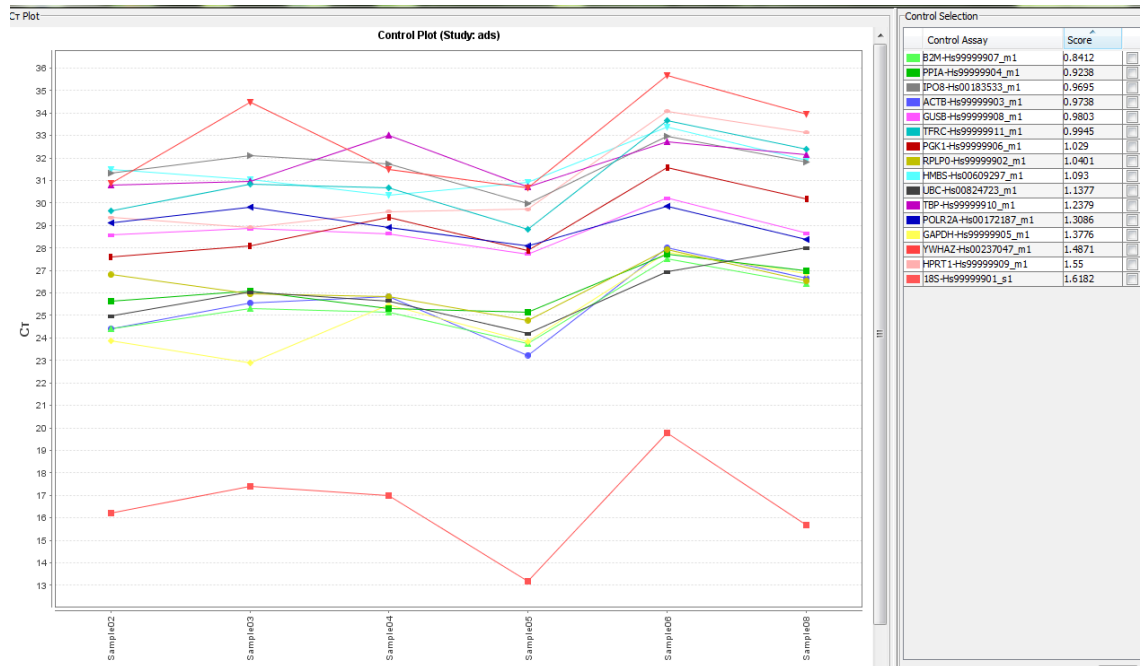


FIGURA 06 – ANÁLISE DE ESTABILIDADE DOS CANDIDATOS A GENES DE REFERÊNCIA. Análise de estabilidade no *Software Data Assist v.3.0* dos candidatos aos genes de referência incluídos no cartão *TAQ MAN ENDOGENOUS CONTROL PANEL*.

FONTE: *software DataAssist v.3.0*

Na análise com seis amostras (uma amostra tumoral e uma amostra não tumoral foram excluídas por apresentarem problemas na amplificação), os genes mais estáveis foram *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB*, com scores de 0,8412; 0,9238; 0,9695 e 0,9738, respectivamente. Os genes selecionados para utilização neste estudo foram *B2M*, *PPIA* e *ACTB*, sendo que os dois últimos já eram padronizados no laboratório. Os iniciadores para o gene *B2M* foram obtidos a partir do trabalho de Fu *et al.*, 2010. O QUADRO 04 apresenta as sequências dos iniciadores dos genes de referência selecionados.

GENE	DIREÇÃO	SEQUÊNCIA	ALINHAMENTO	TAMANHO (pb)	T _m °C
<i>B2M</i>	F	5'- TGA CTTTGT CACAGCCCAAGATA	Exon 2	75	56,3
	R	5'- CGGCATCTTCAAACCTCCA	Éxon 3		55,2
<i>PPIA</i>	F	5'- GACCCAACACAAATGGTTCC	Éxon 4	89	64,0
	R	5'- TTTCACTTTGCCAAACACCA	Éxon 5		64,1
<i>ACTB</i>	F	5'- GATGCAGAAGGAGATCACTGC	Éxon 5	77	63,9
	R	5'- AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	Éxon 6		64,0

QUADRO 4 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES *FOWARD* E *REVERSE* PARA OS GENES DE REFERÊNCIA SELECIONADOS.

FONTE: OLIVEIRA, S.V.F. (2011).

LEGENDA: **F**, *foward*; **R**, *reverse*; **ALINHAMENTO**, região de hibridização do iniciador no gene alvo; **TAMANHO**, tamanho em pares de bases do produto amplificado; **pb**, pares de bases; **T_m °C**, temperatura de *melting* em graus Celsius.

Todos os iniciadores dos genes referências, assim como dos genes alvos, foram desenhados e testados conforme as condições adequadas para utilização em reações de RTq-PCR (BUSTIN *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010). O tamanho dos produtos de PCR deve apresentar entre 75 e 150 pb de comprimento, com concentração de guanina e citosina (GC) entre 50% e 60% e sem formação de estruturas secundárias. Os iniciadores devem apresentar entre 50 e 60% de concentração de GC e temperatura de hibridização entre 55 e 65 °C.

Corroborando a nossa seleção, Morse *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade de seis genes comumente usados como controles endógenos em quatro linhagens de carcinomas mamários, e observaram os genes *ACTB*, *PPIA* e *GAPDH* como os menos variáveis. Mcneill, Miller e Kerin (2007) validaram os genes *MRPL19* e *PPIA* como a combinação mais estável de controles endógenos para estudos de expressão gênica em tumores de mama. Neste trabalho, o gene *B2M* se apresentou como o terceiro mais estável entre as seis amostras de alterações benignas da mama e 21 amostras de tumores mamários. Kheirseid *et al.* (2010) escolheram os genes *PPIA* e *B2M* como a combinação mais estável de genes de referência em um experimento com carcinomas colorretais, a partir de um painel com iniciadores para 13 genes de controle endógeno comumente utilizados e com base nos logaritmos de

estabilidade *GeNorm*, *NormFinder* e *qBasePlus* (valores de estabilidade (M): 1,005; 0,007; 0,460).

Esta etapa foi realizada pela doutoranda Sarah Vieira Franco de Oliveira, no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do câncer, que faz parte do núcleo de pesquisa do Hospital A.C. Camargo, em São Paulo.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES EM ESTUDO

As sequências dos iniciadores para os genes *PDIA3* e *PDIA6* foram obtidas com o auxílio do software *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), respeitando as condições ideais (BUSTIN *et al.*, 2009) para a realização de RTq-PCR (QUADRO 5).

GENE	DIREÇÃO	SEQUÊNCIA	TAMANHO (pb)	Th °C
<i>PDIA3</i>	F	AAGGCTCTGGAGAGGTTCTGC	22	66.4
	R	GGCCCATCATTGCTCTCTGGGA	22	66.4
<i>PDIA6</i>	F	GGAGGTCAGTATGGTGTTTCAGGGAT	25	66.2
	R	CTGCCACCTTGGTAATCTTCTGGTC	25	66.2

QUADRO 5: SEQUÊNCIA DOS INICIADORES FORWARD E REVERSE PARA OS GENES ALVOS.

FONTE: O autor, 2012.

LEGENDA: **F**, forward; **R**, reverse; **TAMANHO**, tamanho em pares de bases do produto amplificado; **pb**, pares de bases; **Th °C**, temperatura de hibridização em graus Celsius.

As reações de RTq-PCR foram executadas no equipamento *RealPlex* (*Eppendorf*) com a utilização do protocolo *SYBR Green* (*Applied Biosystems*). A análise da expressão gênica por Quantificação Relativa foi realizada pelo Método do $\Delta\Delta Ct$, de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ amostra calibradora}$$

A expressão do gene alvo na amostra em relação à amostra calibradora é obtida pela fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Foram comparadas as expressões dos genes alvos entre amostrais tumorais e não tumorais, subgrupos tumorais, associação dos níveis de expressão com grau histológico (I, II, III), tamanho do tumor, presença ou ausência de metástases em

linfonodos, receptores hormonais (triplo negativos, *ERBB2* positivos e negativos, ER/PR positivos e negativos), metástases em sítios distantes.

PADRONIZAÇÃO DE REAÇÃO

Verificação do gradiente de temperatura

Este experimento foi utilizado para determinar qual a melhor temperatura a ser utilizada nas reações de RTq-PCR em comparação aos genes referência para garantir uma melhor eficiência. Este passo baseia-se na temperatura de pareamento (*Melting temperature* – T_m) dos genes, e corresponde à temperatura na qual metade das moléculas está pareada e a outra não (FIGURAS 7 e 8).

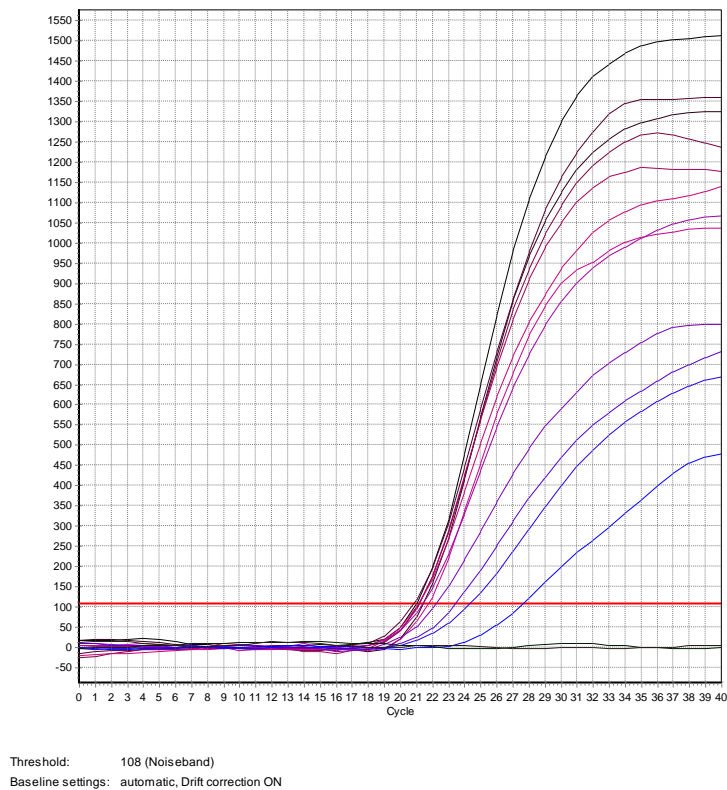
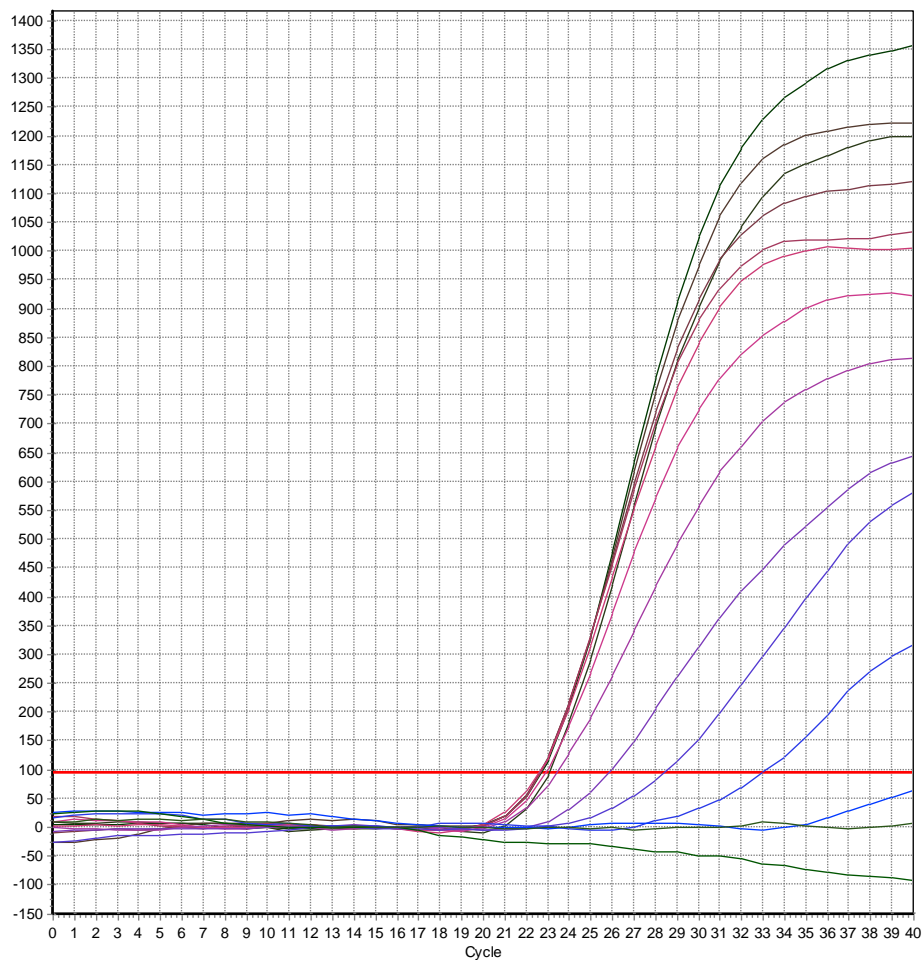


FIGURA 7: VERIFICAÇÃO DO GRADIENTE DO GENE *PDIA3*.

FONTE: *Software RealPlex (Eppendorf) (2012)*.

LEGENDA: **fluorescence**, fluorescência; **temperature**, temperatura; **Threshold**, limiar de início de detecção da fluorescência emitida pelo *Syber Green* associado à amostra.



Threshold: 93 (Noiseband)
Baseline settings: automatic, Drift correction ON

FIGURA 8: VERIFICAÇÃO DO GRADIENTE DO GENE *PDIA6*.

FONTE: *Software RealPlex (Eppendorf) (2012)*.

LEGENDA: **fluorescence**, fluorescência; **temperature**, temperatura; **Threshold**, limiar de início de detecção da fluorescência emitida pelo *Syber Green* associado à amostra.

Determinação das eficiências de reação

Para a determinação das eficiências das reações foi utilizado o *software Miner*. O programa utiliza os dados brutos das fluorescências fornecidas pelo aparelho de RTq-PCR através de uma planilha de dados (FIGURA 9). Após o descarregamento destes dados no *Miner*, o programa fornece valores de Ct e a eficiência das reações permitindo o subsequente cálculo das quantificações relativas (disponível em: [http://www.miner.ewindup.info/.](http://www.miner.ewindup.info/)). Somente foram submetidas à análise de eficiências as reações que apresentaram desvios padrões inferiores a 0.30 entre as replicatas (FIGURA 10). Para este trabalho foram aceitas as eficiências entre 85 a 115%.

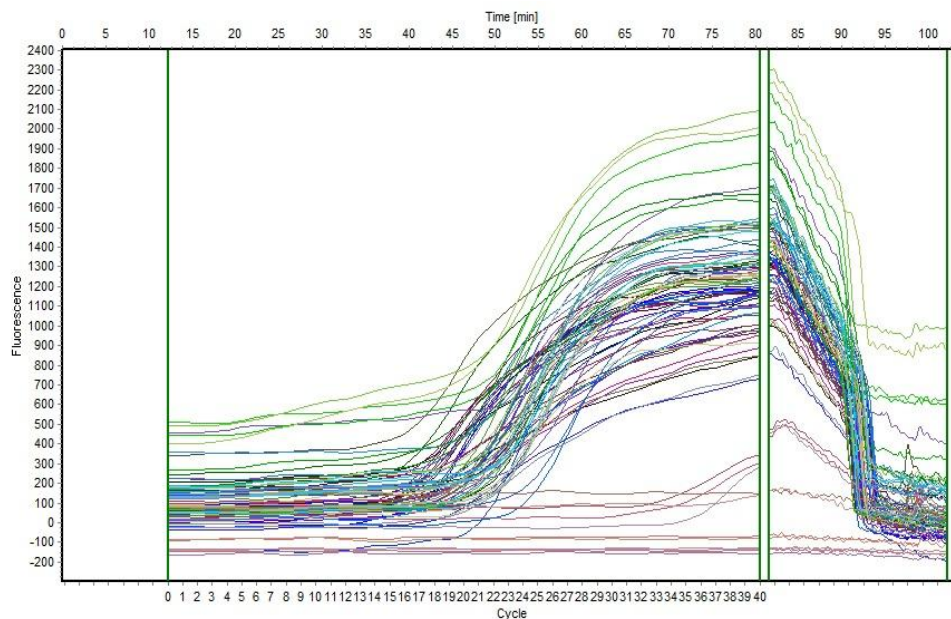
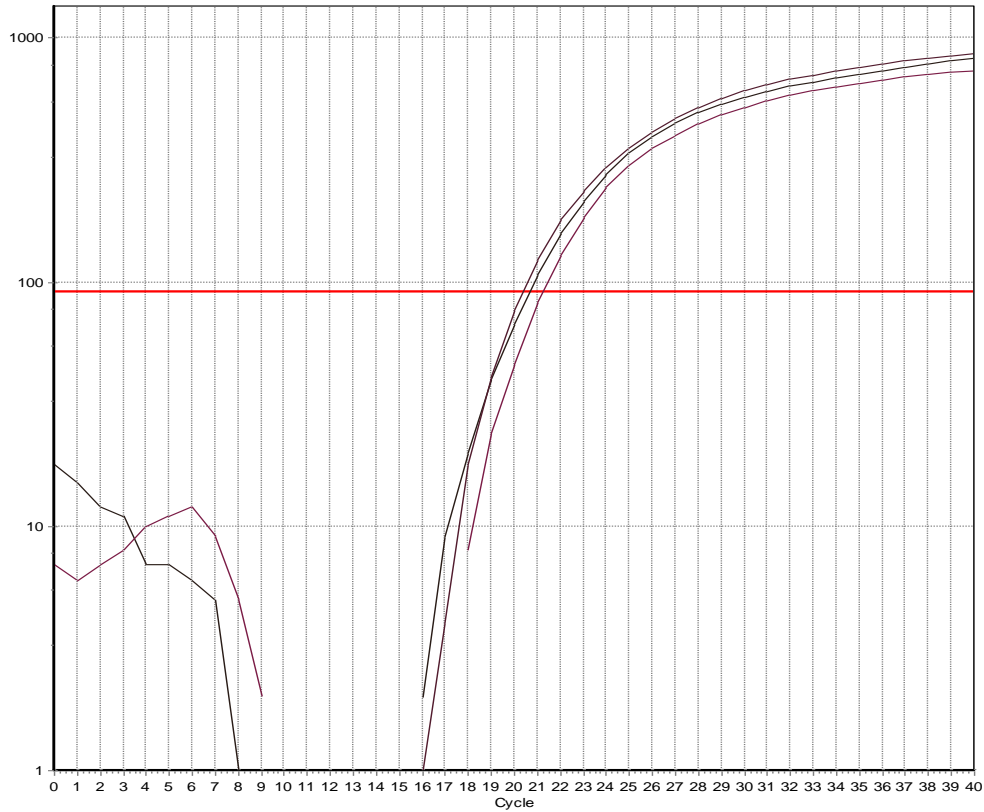


FIGURA 9: OBTENÇÃO DOS DADOS BRUTOS DA FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO EQUIPAMENTO REAL PLEX (EPPENDORF).

FONTE: *Software RealPlex (Eppendorf)* (2012).

LEGENDA: **fluorescence**, fluorescência; **temperature**, temperatura; **Time**, tempo; **Cycle**, ciclo.



Threshold: 91 (Noiseband)
 Baseline settings: automatic, Drift correction ON

FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DAS REPLICATAS EM ESCALA LOGARÍTMICA.

FONTE: *Software RealPlex (Eppendorf) (2012).*

LEGENDA: **fluorescence**, fluorescência; **Cycle**, ciclo.

Valores de Ct	Média	Desvio-padrão
17,656	17,622	0,184366
17,787		
17,423		

TABELA 4: EXEMPLO DE CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DO DESVIO PADRÃO DAS CURVAS DE REAÇÃO.

FONTE: O Autor (2013).

Reações de RTq-PCR

As reações de RTq-PCR foram padronizadas em relação ao volume total de cada reação, temperatura de hibridização e concentração de iniciadores *forward* e *reverse*. Para todas as padronizações, foram utilizadas as mesmas amostras. Abaixo, o QUADRO 6 apresenta a reação padronizada de RTq-PCR que foi utilizada nos ensaios de expressão gênica.

Reagentes	Volume na reação (µl)	Total na reação
Água ultra-pura	2,6	
Iniciador <i>forward</i> (10 pmol/µl)	0,2	2,0 pmol
Iniciador <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	0,2	2,0 pmol
SYBR green PCR Master Mix	5,0	
cDNA (7,5 ng/µl)	2,0	15,0 ng
-	TOTAL = 10	-
Temperatura de melting dos iniciadores dos genes alvos	Padronizado em 63,5°C para ambos os genes	
Programa de PCR	2 min a 50 °C	
	10 min a 95 °C	
	15 seg a 95 °C e 1 min a 63.5 °C	
	15 seg a 95 °C e 63.5 °C (40 X) Curva de dissociação (pré-programada)	
	15 seg a 95 °C e 15 seg a 60 °C	
	20 min aquecimento e 15 seg a 95 °C	

QUADRO 6 – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RTq-PCR.

FONTE – O autor (2012).

LEGENDA: **pmol**, pico mol; **µl**, microlitro; **ng**, nano gramas, **°C**, graus Celsius.

Análise estatística

A análise da expressão gênica por Quantificação Relativa foi realizada pelo Método do $\Delta\Delta\text{Ct}$. O Teste de Homogeneidade foi realizado para verificar se era possível tratar ambos os genes de referência (*ACTB* e *B2M*) como um único grupo, o grau de significância aceito foi de 5%. Na sequência, foi utilizado o teste de normalidade entre os grupos. Aqueles que apresentaram resultados dentro da curva de normalidade foram destinados o teste *t* de *Student*. Já os que não apresentavam curva dentro da normalidade foram destinados ao teste não paramétrico Mann-Whitney. A significância das diferenças entre as médias de quantificação de expressão entre os grupos estudados foi analisada através do teste *t* de *Student*, com o auxílio do pacote estatístico *GraphPad Prism 6*.

APÊNDICE II

A PCR em tempo real e sua importância nos estudos biológicos

O advento da PCR em tempo real e RTq-PCR (PCR quantitativa em tempo real) mudou drasticamente o campo da pesquisa na expressão gênica. A PCR em tempo real é um método que coleta dados durante todo o processo de PCR, combinando assim a amplificação e detecção numa única etapa. Isso é obtido através da utilização de uma variedade de diferentes fluorescentes químicos que correlacionam a intensidade da fluorescência emitida com a concentração do produto de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1993). As reações são caracterizadas pelo ponto no tempo (ou ciclo de PCR) onde a amplificação do alvo é primeiramente detectada. Este valor é, frequentemente, chamado de limiar do ciclo (Ct – *cycle threshold*), o ponto no qual a intensidade da fluorescência é maior do que a fluorescência de fundo. Conseqüentemente, quanto maior a quantidade de DNA alvo no material inicial, mais rapidamente aparecerá um aumento significativo no sinal da fluorescência, produzindo um Ct mais baixo (HEID *et al.*, 1996).

A PCR em tempo real pode ser dividida em quatro etapas (FIGURA 11): a fase linear, fase exponencial de crescimento, fase linear logarítmica (também conhecida como exponencial), e a fase de platô (TICHOPAD *et al.*, 2003). Durante a fase linear (entre os primeiros 15 ciclos), a PCR está começando, e a emissão de fluorescência de cada ciclo ainda não ultrapassou o limiar de detecção. A linha de base da fluorescência é calculada neste momento. No início da fase exponencial, a quantidade de fluorescência que ultrapassou o limiar, onde é significativamente maior (normalmente, 10 vezes a mais do que o desvio padrão da linha de base) do que os níveis de ruído. Esse ponto é chamado de Ct pela ABI PRISM[®] (Applied Biosystems) ou ponto de cruzamento (CP) pela LightCycler[®] (Roche Applied Science) (HEID *et al.*, 1996; VON AHSEN *et al.*, 1999). Este valor representa o início do número de cópias no molde original que ultrapassa o limiar e se torna passível de detecção sendo usado para calcular os resultados da reação (HEID *et al.*, 1996). Durante a fase linear logarítmica a PCR atinge o período ótimo de amplificação com os produtos de PCR duplicados ao final de cada ciclo em condições ideais de

reação. Por fim, a fase de platô é atingida quando os componentes da reação limitam-se e a intensidade da fluorescência não é mais útil para o cálculo dos dados (BUSTIN, 2000).

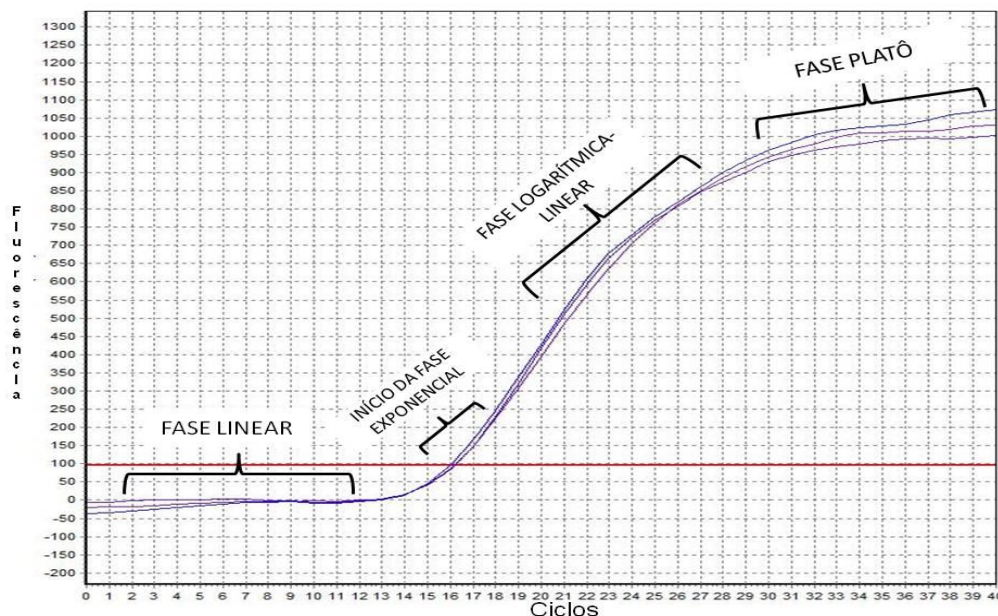


FIGURA 11: FASES DA CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL. A figura acima mostra o acúmulo de emissão de fluorescência a cada ciclo da reação.

FONTE: *Software RealPlex (Eppendorf) (2012).*

A emissão dos compostos gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto de PCR. Logo, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o *SYBR[®] Green* e *TaqMan[®]*. Esses fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Cada sistema de leitura de PCR em tempo real utilizará estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos.

Há dois tipos padrão de quantificação do produto de PCR em tempo real: quantificação absoluta e relativa. A quantificação absoluta utiliza padrões diluídos em séries de concentrações conhecidas para gerar uma curva padrão. A curva padrão produz uma relação linear entre Ct e quantidade inicial do total de RNA ou cDNA (DNA complementar, obtido a partir da retrotranscrição do RNA), seguido da determinação da concentração desconhecida baseada em seus valores de Ct (HEID *et al.*, 1996). Este método assume que todos os padrões e as amostras têm eficiências de amplificação aproximadamente iguais (SOUAZE *et al.*, 1996). Para quantificação relativa, mudanças na expressão gênica da amostra são medidas

baseadas em cada um dos padrões externos ou amostras de referência, também chamada de calibrador (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Quando usado um calibrador os resultados são esperados como uma razão alvo/referência. Há vários meios matemáticos para verificar essa diferença entre as razões que normalizam a expressão gênica na quantificação relativa. Dependendo do método aplicado, os resultados podem ser diferentes assim como a taxa de erro (LIU e SAINT, 2002; MULLER *et al.*, 2002).

A RTq-PCR (produto gerado a partir de uma retrotranscrição – RT) vem sendo o método mais utilizado para caracterização ou confirmação da expressão gênica padrão e comparando níveis de mRNA em diferentes amostras populacionais (ORLANDO *et al.*, 2000). Dentre as vantagens perante a PCR qualitativa estão a facilidade de quantificação, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade da análise, melhor controle de qualidade do processo e menor risco de contaminação.

ANEXO I**Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido**

Nome do Estudo: “Análise da expressão dos genes *PDIA3* e *PDIA6* em carcinomas primários de mama.”

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial. E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro