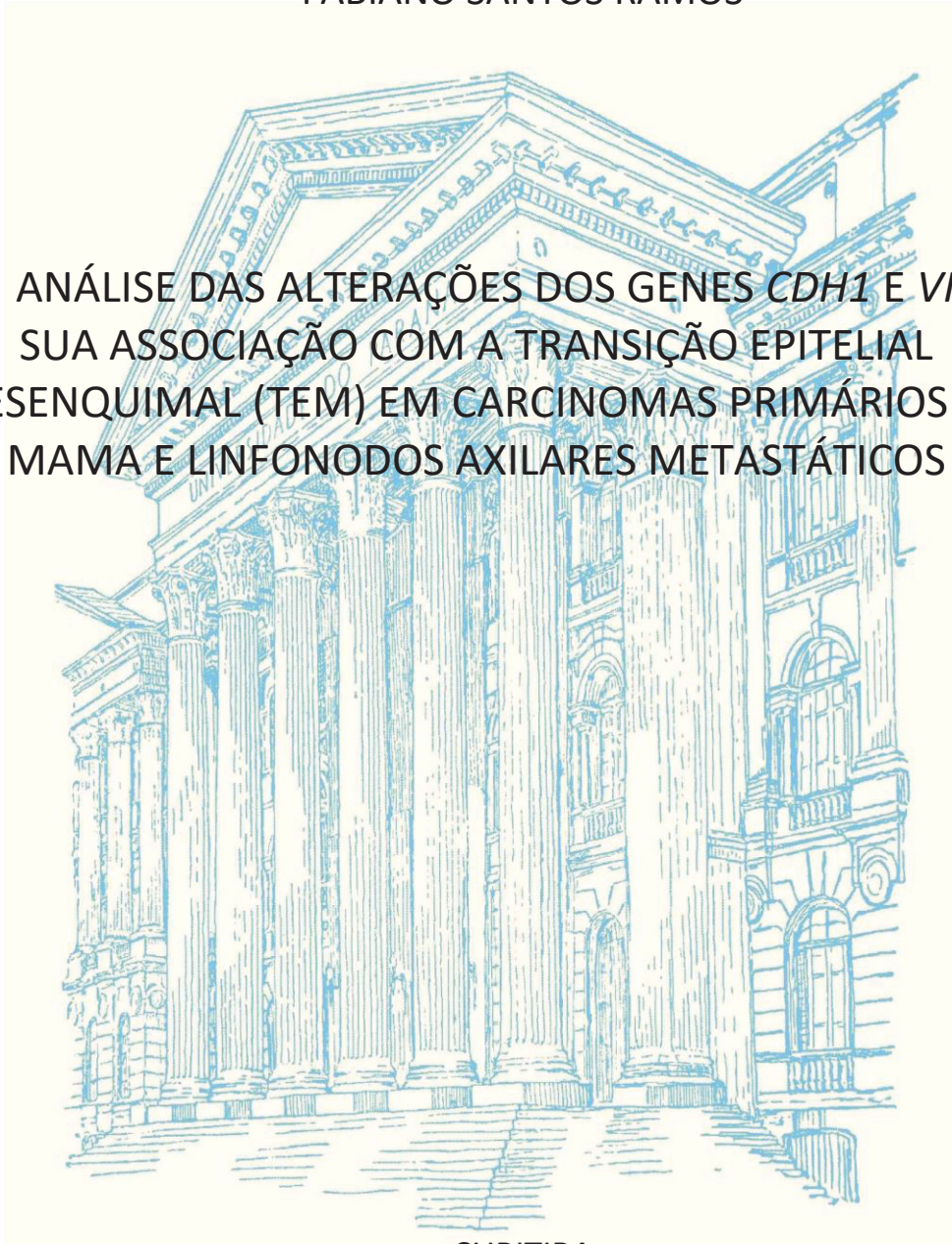


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANO SANTOS RAMOS

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DOS GENES *CDH1* E *VIM* E
SUA ASSOCIAÇÃO COM A TRANSIÇÃO EPITELIAL
MESENQUIMAL (TEM) EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE
MAMA E LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS



CURITIBA

2019

FABIANO SANTOS RAMOS

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DOS GENES *CDH1* E *VIM* E
SUA ASSOCIAÇÃO COM A TRANSIÇÃO EPITELIAL
MESENQUIMAL (TEM) EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE
MAMA E LINFONODOS AXILARES METASTÁTICOS

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade
Federal do Paraná, setor de
Ciências Biológicas como requisito
parcial à obtenção do título de
Doutor em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Enilze M. S.
F. Ribeiro.

Coorientador: Prof. Dr. Iglénir
João Cavalli.

Curitiba, 2019

Universidade Federal do Paraná

Sistema de Bibliotecas

(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ramos, Fabiano Santos

Análise das alterações dos genes *CDH1* e *VIM* e sua associação com a transição epitelial mesenquimal (TEM) em carcinomas primários de mama e linfonodos axilares metastáticos. / Fabiano Santos Ramos. – Curitiba, 2019.

121 p.: il.

Orientadora: Enilze M. S. F. Ribeiro

Coorientador: Iglénir João Cavalli

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FABIANO SANTOS RAMOS** intitulada: "**Análise das alterações dos genes CDH1 e VIM e sua associação com a transição epitelial mesenquimal (TEM) em carcinomas primários de mama e linfonodos axilares metastáticos**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Outubro de 2017.

ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO
Presidente da Banca Examinadora

SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA
Avaliador Externo

ROBERTA LOSI-GUEMBAROVSKI
Avaliador Externo

DANIELA FIORI GRADIA
Avaliador Interno

VALÉRIA MARIA SPERANDIO ROXO
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais que tanto lutaram para que seguisse caminhos tão desconhecidos para nós. Sempre me incentivaram a ir longe, mas nunca tão longe que não soubesse como voltar para casa.

Aos meus colegas de laboratório durante todos esses anos, desde iniciação de científica sempre me auxiliaram e compartilham seus conhecimentos.

A minha orientadora Prof.^a Dr^a Enilze Ribeiro que sempre me auxiliou e muitas vezes orientou pelos melhores caminhos, e me auxiliando na construção crítica, e por ter possibilitado a minha entrada ao laboratório. Ao Prof. Dr Iglener Cavalli pelo aprendizado teórico e estatístico, além de me mostrar sempre que o fundamental para um profissional é a formação pessoal.

Aos colaboradores Dr^a Luciane Cavalli, Dr Cícero Urban, Dr Rubens Lima, Dr^a Claudia Rainho e Dr^a Jaqueline Oliveira com participação igualmente essencial para possibilitar que esse projeto se realizasse.

A banca avaliadora Dr^a Roberta Losi-Guembarovski, Dr^a Sarah Vieira Franco de Oliveira Maciel, Dr^a Daniela Fiori Gradia, Dr^a Valeria Maria Munhoz Sperandio-Roxo e Dr^a Roseli Wassem pela gentileza de dispor seu tempo para contribuir valiosamente para esse trabalho.

CAPES e CNPq pelas bolsas de estudo e pesquisa disponibilizadas para mim e meus orientadores e pelo apoio financeiro ao projeto. Ao programa de genética da UFPR, por proporcionar minha formação.

Por fim, que agradecer muito a minha esposa Fernanda por sempre me apoiar, motivar e criticar nos momentos em que necessitava. Por acreditar muitas vezes mais em mim do que eu mesmo. Por ter me dado a filha mais linda do mundo, nossa gordica (Ana Clara) querida. Obrigado por todo o suporte meu amor, sem você não sei se teria conseguido.

*“Talvez não tenha conseguido
fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que
era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente em mulheres e apresenta o maior índice de mortalidade. A transição epitelial-mesenquimal (TEM) contribui para o processo metastático visto que é um evento onde células epiteliais neoplásicas ganham características mesenquimais. Para isso, uma série de mudanças podem ocorrer como alterações na expressão e no número de cópias dos genes. O gene *VIM* codifica a vimentina, uma proteína estrutural do citoesqueleto que contribui para a manutenção celular, garantindo a integridade citoplasmática, dando forma à célula e suporte às organelas. Quando a célula adquire a capacidade de deslocamento, a expressão de *VIM* se encontra alterada assim como a de *CDH1*. Este gene codifica a E-caderina, proteína que atua na adesão de células epiteliais apresentando baixa expressão quando relacionada com presença de metástase, diminuição da diferenciação do tumor e pior sobrevida. A análise da expressão destes genes e de dois mecanismos de regulação dos mesmos (número de cópias e *status* de metilação dos promotores) contribuirá para o entendimento da TEM em carcinomas primários de mama. As amostras (total de 137 tumores, 15 não tumorais e 28 linfonodos) foram cedidas pelo Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, PR. As análises das expressões gênicas de *CDH1* e *VIM* indicaram que nas amostras do sítio primário predominava o fenótipo epitelial. Posteriormente, foi observada a inversão das respectivas expressões com a progressão da doença, quando se analisou a expressão em linfonodo axilar metastático (2,85 para 0,30; 0,81 para 1,74, respectivamente para *CDH1* e *VIM*). Foram analisados dois mecanismos que poderiam interferir na expressão gênica: o número de cópias gênicas e a metilação da região promotora. Para avaliar a variação do número de cópias foi utilizado PCR em tempo real, através da comparação com controle endógeno conhecido. Na análise de metilação da região promotora dos genes alvos foi utilizado o método de MSRE-PCR. Para o gene *CDH1* verificou-se que a variação do número de cópias e a metilação parecem ter maior influência na regulação da expressão do que para o gene *VIM*. Em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos, verificou-se que a expressão dos genes e a alteração de seus números de cópias não são bons marcadores para distinguir subgrupos, porém o padrão de expressão é um forte indicador de progressão da doença.

Palavras-chave: Câncer, transição, *CDH1*, *VIM*, TEM, gene, PCR

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent type of cancer in women and has the highest mortality rate. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) contributes to the metastatic process since it is an event where neoplastic epithelial cells gain mesenchymal characteristics. For this, a number of changes may occur like changes in expression and in number of copies of genes. The *VIM* gene encodes vimentin, a structural protein of the cytoskeleton that contributes to cell maintenance by ensuring cytoplasmic integrity, giving cell shape and organelle support. When the cell acquires displacement capacity, the expression of *VIM* is altered, as well as *CDH1* expression. This gene encodes E-cadherin, a protein that acts on the adhesion of epithelial cells, presenting low expression when related to the presence of metastasis, decreased tumor differentiation and worst survival. The analysis of gene expression, copy number and promoter methylation status of these genes will contribute to the understanding of EMT in primary breast carcinomas. The samples were provided by Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, PR. DNA extraction was performed using the Phenol-Chloroform method. Analysis of the *CDH1* and *VIM* gene expression indicated that the epithelial phenotype predominated at the primary site samples. Subsequently, inversion of the respective expressions with disease progression was observed when the expression of metastatic axillary lymph node was analyzed (2.85 to 0.30, 0.81 to 1.74, respectively for *CDH1* and *VIM*). Two mechanisms that could interfere with gene expression, number of gene copies and methylation of the promoter region, were analyzed. For the *CDH1* gene it was found that the copy number variation and methylation appear to have a greater influence on the regulation of expression than for the *VIM* gene. Regarding the clinical and histopathological parameters, it was verified that the expression of genes and the alteration of their copy numbers are not good markers to distinguish subgroups, but the expression pattern is a strong indicator of disease progression.

Keywords: Cancer, transition, *CDH1*, *VIM*, TEM, gene, PCR

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* NO SÍTIO PRIMÁRIO. 60
- FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE A IDADE DAS PACIENTES 62
- FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASES EM LINFONODOS 62
- FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE AO GRAU DO TUMOR 63
- FIGURA 5: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE AO RECEPTOR DE ESTRÓGENO 63
- FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE AO RECEPTOR DE PROGESTERONA 64
- FIGURA 7: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE AO RECEPTOR HER2 64
- FIGURA 8: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EXPRESSÃO DOS GENES NOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA 65
- FIGURA 9: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TUMOR PRIMÁRIO E NO TECIDO METASTÁTICO. 65
- FIGURA 10: ANÁLISE COMPARATIVA DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA. 66
- FIGURA 11: NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CDH1* (A) E *VIM* (B). 67

FIGURA 12: DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS ENTRE OS GENES DE ESTUDOS. 69

FIGURA 13: DISTRIBUIÇÃO DO PERCENTUAL DE METILAÇÃO ENTRE GENES *CDH1* E *VIM*. 71

FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO AMOSTRAL EXPRESSÃO GÊNICA X VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS. 73

FIGURA 15: REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO AMOSTRAL EXPRESSÃO GÊNICA X PERCENTUAL DE METILAÇÃO PARA O GENE *CDH1*. 73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE TUMORES MAMÁRIOS.	44
TABELA 2: DADOS RELATIVOS À EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES <i>CDH1</i> E <i>VIM</i> E CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS.	61
TABELA 3: ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS PARA OS GENES <i>CDH1</i> E <i>VIM</i> .	67
TABELA 4: PERCENTUAIS DAS ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS ENCONTRADOS NOS GENES <i>CDH1</i> E <i>VIM</i> .	68
TABELA 5: PERCENTUAL (%) DE METILAÇÃO POR GENE ALVO.	70
TABELA 6: VALORES OBTIDOS PELOS TRÊS MÉTODOS UTILIZADOS.	72

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: GENES E INICIADORES UTILIZADOS REFERENCIADOS PELOS SEUS CÓDIGOS DISPONIBILIZADOS PELO FABRICANTE E RESPECTIVOS ENSAIOS.	54
QUADRO 2: REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO.	55
QUADRO 3: VALORES DE EXPRESSÃO DE AMOSTRAS NÃO TUMORAIS PARA OS GENES <i>CDH1</i> E <i>VIM</i> .	57
QUADRO 4: VALORES DE EXPRESSÃO DE AMOSTRAS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS PARA O GENE <i>CDH1</i> .	58
QUADRO 5: VALORES DE EXPRESSÃO DE AMOSTRAS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS PARA O GENE <i>VIM</i> .	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA – Do inglês alpha-Smooth Muscle Actin

ACTB – Beta actina

AICR/WCRF – Do inglês American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund International

ATM – Do inglês ATM serine/threonine kinase

BRCA1 – Do inglês Breast Cancer 1

BRCA2 – Do inglês Breast Cancer 2

BCR-ABL – Do inglês Abelson murine leukemia-breakpoint cluster region

CDH1 – Caderina 1

CDH3 – Caderina-3

CDI – Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS – Carcinoma Ductal *in situ*

CDKN2A – Do inglês Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

CLS – Carcinoma Lobular *in situ*

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

COX2 – Ciclo-oxigenase-2

CT – Do inglês Cycle Threshold

DNAc – DNA complementar

EGF – Do inglês Epidermal growth factor

ERBB2 – Proteína tirosina cinase Erb-b2, do inglês *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

EZH2 – Do inglês enhancer of zeste homolog 2

FADD – Do inglês Fas associated with death domain gene

FC – Do inglês Fold Change

FCE – Fator de Crescimento Epidermal

FOSL1 – Do inglês gene Fos-related antigen 1

FSP1 – Do inglês Fibroblast-Specific protein1

GAPDH – Do inglês, gene Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GSTP1 – Do inglês Glutathione S-transferase P gene

HDA – Hiperplasia Ductal Atípica

HeLA – Linhagem célula com nome oriundo de Henrietta Lacks

HEL113 – Do inglês Epididymis luminal protein 113

HER2 – Do inglês Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HNSG – Hospital Nossa Senhora das Graças

IGF-IR – Receptor do Fator de Crescimento tipo 1 de insulina

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LINF – Linfonodo

lncRNA – Do inglês Long non-coding RNA

MCF-7 – Acrônimo de Michigan Cancer Foundation-7.

MGMT – O-6- Metilguanina-DNA metiltransferase

MHL – Do inglês multL homolog (human)

miRNA – MicroRNA

MMP1/2/9 – Matriz metaloproteinase 1/2/9

MSRE – Do inglês Methylation-sensitive restriction enzyme

N – Número Amostral

NGF- $\kappa\beta$ – Do inglês Factor nuclear Kappa B

NT – Não Tumoral

OMS – Organização Mundial da Saúde

PTEN – Do inglês Phosphatase and tensin homolg

RAS – Família de oncogenes Ras

RAS-MAPK – Do inglês Ras-dependent mitogen-activated protein kinase

RB – Gene do Retinoblastoma

RE – Receptor de estrogênio

RNA_m – RNA mensageiro

RP – Receptor de Progesterona

RPPH1 – RNase P

RT-qPCR – PCR Quantitativa em Tempo Real

SP – Sítio Primário

TEM – Transição Epitelial-Mesenquimal

TP53 – Do inglês Tumor Protein p53

TN – Triplo Negativo

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VIM – VIM

VNC – Variação do Número de Cópias

ZEB – Do inglês Zinc finger E-box

ZO-1 – Do inglês Zonula occludens-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 CÂNCER E O PROCESSO METASTÁTICO	18
2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	21
2.3 O CÂNCER DE MAMA E SEUS FATORES DE RISCO	22
2.4 METÁSTASE E O CÂNCER DE MAMA	27
2.5 CÂNCER DE MAMA E SUAS CLASSIFICAÇÕES	28
2.6 GENES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA DE ORIGEM SOMÁTICA	32
2.7 VIMENTINA E O GENE <i>VIM</i>	33
2.8 E-CADERINA E O GENE <i>CHD1</i>	35
2.9 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL (TEM) E A EXPRESSÃO DE <i>CDH1</i> , <i>VIM</i> E miRNAs RELACIONADOS	36
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	43
5.2 EXPRESSÃO DE RNAm	51
5.2.1 Extração do RNA total e obtenção de cDNA	51
5.2.2 PCR quantitativa em tempo real	51
5.3 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS	52
5.3.1. Extração do DNA	52
5.3.2. PCR quantitativa em tempo real	53
5.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>CDH1</i> E <i>VIM</i>	55
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6.RESULTADOS	57
6.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	57

6.2 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS	66
6.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO	70
6.4 ANÁLISE COMPARATIVA	72
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
CAPÍTULO I	101
ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo descontrole do ciclo celular acarretando no aumento no número de células e na invasão de tecidos. Fatores ambientais, genéticos e/ou epigenéticos podem desencadear a doença. Segundo estimativas do Globocan consolidadas para o ano de 2012, 14,1 milhões de pessoas foram afetadas pelo câncer (excluindo câncer de pele não melanoma). O processo metastático é um evento que permite que as células do tumor primário invadam tecidos distantes. Para que isso ocorra, várias mudanças morfofisiológicas devem acontecer nas células. A Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM) permite que as células alterem sua forma, ganhem mobilidade e consigam invadir tecidos adjacentes e/ou distantes contribuindo para o aparecimento de metástases. A TEM envolve mudanças no perfil de expressão nas células como a repressão de E-caderina e a indução de vimentina. O gene *CDH1* localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1), codifica a E-caderina que é importante para a adesão celular por possuir domínios extracelulares, citoplasmáticos e transmembrânicos. A expressão reduzida de E-caderina foi correlacionada com características patológicas como diminuição da diferenciação do tumor, presença de metástases e menor sobrevida (DEBIES e WELCH, 2001). Localizado no braço curto do cromossomo 10 (10p13), o gene *VIM* codifica a vimentina pertencente à classe III de filamentos intermediários, que tem como funções manter a integridade do citoplasma, reparar a célula e estabilizar as interações que ocorrem no citoesqueleto. A vimentina já é considerada como um marcador mesenquimal da TEM (THIERY, 2002). O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica, a variação do número de cópias e o *status* de metilação da região promotora dos genes *VIM* e *CDH1* pela análise dos tecidos mamários normais (expressão gênica), carcinomas primários de mama e amostras de linfonodos axilares, visando contribuir para a compreensão da TEM e da progressão da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER E O PROCESSO METASTÁTICO

O câncer é uma doença multifatorial, que é desencadeada pelo acúmulo de alterações genéticas, tais como mutações pontuais, rearranjos, deleções e ampliações (STORCHOVA e PELLMAN, 2004) e epigenéticas (metilação, acetilação, ubiquitinação etc.) que resultam nas modificações de expressão dos oncogenes e genes supressores de tumor (NICHOLSON e ANDERSON, 2002). A incidência e mortalidade por câncer no mundo vêm aumentando a cada ano, 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 tem como consequência uma alteração genética (*driver mutation*), 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 conduzindo à formação de tumores e, eventualmente, o estabelecimento de metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Tem-se sugerido pelo menos 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 (HANAHAN e WEINBERG, 2000). As mutações que levam à manifestação desses fenótipos 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 (provocados por células do sistema imune que em muitas ocasiões favorecem a progressão tumoral), reprogramação do metabolismo celular e evasão da resposta imune contra o tumor (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

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. Os processos metastáticos ocorrem em várias etapas que requerem a ação coordenada de vários genes: a fuga de células cancerosas do tumor primário, que se torna maligno por adquirir a mobilidade, capazes de entrar 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).

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 do DNA. Os mecanismos epigenéticos mais claros, até o momento, são as alterações no padrão de metilação do DNA, as modificações covalentes de proteínas histonas e RNAs de interferência. 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 (EHLICH, 2002). Em contrapartida, quase todos os tipos de cânceres estudados apresentam aumento de metilação em ilhas CpG próximas aos promotores levando à inativação transcricional e representando um importante mecanismo de silenciamento de genes na patogênese das neoplasias (BAYLIN e HERMAN, 2000; EGGER *et al.*, 2004). Este fenômeno é um importante mecanismo de inativação de genes supressores de tumor (JONES e BAYLIN, 2002) dentro do modelo proposto por Knudson (KNUDSON, 1971) na hipótese dos dois eventos, sendo tão comum quanto a ocorrência de mutações. O primeiro caso de hipermetilação foi descrito no gene que codifica a proteína do retinoblastoma (*RB*) (GREGER *et al.*, 1989), um supressor de tumor. 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), *CDH1* em cânceres orais e mamários (LOMBAERTS *et al.*, 2006; MAEDA *et al.*, 2007) 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 tumoral. 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 são regulados epigeneticamente nas 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* reprime a expressão de certos genes, como o *CDH1*, e é preditiva de crescimento

invasivo em cânceres de próstata e mama metastáticos (KLEER *et al.*, 2003; TAM e WEINBERG, 2013).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), anualmente o câncer provoca 460 mil mortes e tem-se 14,1 milhões de novos casos em todo o mundo. O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o primeiro no sexo feminino correspondendo, anualmente, a 25% dos casos novos de câncer em mulheres e sendo responsável por cerca de 571 mil mortes em todo o mundo no ano de 2015 (OMS, 2017) e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo mundo. Uma estimativa de 1,7 milhões de novos casos foi esperada para o ano de 2015 no mundo, comparada com aproximadamente 640 mil casos, em 1980.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de novos casos de carcinomas mamários estimados para o ano de 2016 é de 57.960 mil, com um risco estimado de 57.9 casos a cada 100 mil mulheres, o que corresponde à 28,1% dos cânceres entre as mulheres. Para a região Sul a estimativa é de 74 casos para cada 100 mil mulheres, um crescimento acentuado se comparado a dados de anos anteriores.

Estima-se que a sobrevida geral média cumulativa, após cinco anos, seja de 85% nos países desenvolvidos e de 60% naqueles em desenvolvimento. Na população mundial, a sobrevida média, após cinco anos, é de 61%, sendo que os Estados Unidos apresentam uma sobrevida 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 (INCA, 2014).

A maioria dos novos casos de câncer de mama ocorre em mulheres de baixa e média renda familiar, nas quais a incidência está aumentando em até 5% ao ano (IARC, 2002; STEWART e KLEIGUES, 2003), provavelmente devido às dificuldades de acesso aos exames preventivos. A incidência está intimamente relacionada à etnia e ao avanço da idade, embora seja também uma neoplasia relativamente frequente em mulheres mais jovens. 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 sobrevida e maior a incidência e mortalidade por 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 hereditárias (INCA, 2014).

2.3 O CÂNCER DE MAMA E SEUS FATORES DE RISCO

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 ultrapassa as primeiras camadas de células destes ductos, ou invasor, quando invade os tecidos adjacentes. Os cânceres que começam nos lóbulos da mama são chamados de carcinomas lobulares, sendo menos comuns do que os ductais. Carcinomas lobulares, mais frequentemente, acometem 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). Entre 90 a 95% dos casos de

câncer de mama são esporádicos, decorrentes de mutações somáticas que ocorrem durante a vida aliadas aos fatores de risco intrínsecos e extrínsecos (ambientais), enquanto entre 5 a 10% são hereditários, devido à herança de um gene contendo uma mutação germinativa, que confere a essas mulheres predisposição hereditária à doença (ANJUM *et al.*, 2014).

Fatores ambientais, hábitos alimentares, exposição à carcinógenos e fatores intrínsecos ao genoma de cada indivíduo (susceptibilidade genética) 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 hereditários (GRAHAM, 2005). Segundo o INCA (2009), pelo menos um terço dos casos de novos cânceres que ocorrem no mundo anualmente poderia ser prevenido.

O estudo de Tomasetti, Li e Vogelstein (2017) se revelou polêmico ao apresentar dados que vinham diferindo do conceito moderno da origem dos cânceres, onde se defendia que os fatores ambientais seriam os maiores responsáveis pelo surgimento do câncer (85-90%), seguido dos fatores hereditários (em torno de 5-10% dos casos). Segundo esse estudo, fatores ambientais e hereditários seriam responsáveis por cerca de somente 1/3 dos casos e em torno de 2/3 seriam oriundos de alterações replicativas durante o processo de divisão celular de células-tronco nos tecidos. Portanto, tecidos com maior potencial replicativo seriam aqueles com maior incidência de câncer. Logo, além de fatores hereditários e ambientais, somam-se os erros replicativos. Esses dados ainda levantam muitos questionamentos e uma grande corrente de pesquisadores defende que não se pode atribuir ao acaso ou “má sorte” o aparecimento do câncer, e que os cuidados com os fatores de riscos ambientais devem continuar sendo o maior foco de prevenção.

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 suscetibilidade 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, 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).

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 (*American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund International*) 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. Beaber *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 as 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. Schimdt *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 com 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 positivo para os receptores de estrógeno e progesterona (RE/RP+).

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 portadoras de receptores de estrógenos positivos. Na mesma linha, Zhang *et al.* (2007), observaram nas estadunidenses a contribuição do álcool para os cânceres de mama *in situ*, invasivo e *status* dos receptores hormonais (RE/RP). Seus resultados mostram que o aumento de 10 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 câncer de mama estão ainda a presença de casos na família (indicando um histórico familiar), mutações nos genes *BRCA* (principal categoria de genes envolvidos no câncer de mama) ou outros genes de alta e média penetrância (por exemplo, *TP53*, *ATM*, *PTEN*), e biópsia da mama com alterações pré-cancerosas. Dentre os genes associados à predisposição hereditária, os mais conhecidos são *BRCA1* e *BRCA2*, embora mutações em outros genes também tenham sido descritas em pacientes clinicamente identificados como pertencentes às síndromes de câncer de mama hereditário. 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 predisposição 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. 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 pesquisa de mutações nos genes de predisposição deve ser realizado (BOUCHARD *et al.*, 2004).

2.4 METÁSTASE E O CÂNCER DE MAMA

Em alguns tipos de câncer, o de mama entre eles, 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 ainda desconhecidas. Em contraste, outros tipos de câncer, como o pancreático e de pulmão, muitas vezes apresentam metástases generalizadas já no momento do diagnóstico inicial (MASSAGUÉ, 2007). Os riscos de recidivas e de metástases podem, por vezes, serem previstos a partir de certas características do tumor primário de mama, como o tamanho do tumor, o grau histológico, e o padrão de expressão gênica (WEIGELT, PETERSE e VAN'T VEER, 2005; KARNOUB e WEINBERG, 2007). Por exemplo, genes quando expressos em células de câncer de mama levam ao desenvolvimento de metástases pulmonares (DUPONT *et al.*, 2007). Estudos genéticos visando a 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 (MASSAGUÉ, 2007).

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, ainda assim muitas vezes conseguindo obter êxito no propósito de colonização (KARNOUB e WEINBERG, 2007).

2.5 CÂNCER DE MAMA E SUAS CLASSIFICAÇÕES

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 a 8ª edição da “*AJCC Cancer Staging Manual*” pode ser resumido 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 de dois centímetros em sua maior dimensão, restrito quanto à localização.

T2: tumor entre dois e cinco centímetros em seu maior diâmetro ou causando comprometimento moderado aos tecidos adjacentes.

T3: Tumor com mais de cinco centímetros de dimensão invadindo tecidos próximos causando sérios comprometimentos.

T4: Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele (causando ulcerações ou nódulos satélites).

Linfonodos Regionais

Nx: Linfonodos não avaliados.

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 (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* (CDIS), e culmina no estágio potencialmente letal de carcinoma ductal invasivo (CDI) (ALLRED, MOHSIN e 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 constituir em 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* (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2) também denominado *HER2* (Human epidermal growth factor receptor 2) 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, imunoistoquímicos, clínicos e genéticos específicos. Além do gene *ERBB2/HER2*, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) auxiliam na classificação dos cânceres de mama, sendo muito úteis na predição do prognóstico e no direcionamento do tratamento, por exemplo, uso de Tamoxifeno para portadoras de RE e RP positivos determinados pela imunoistoquímica, enquanto a identificação da amplificação do oncogene *HER2* ou superexpressão da sua proteína 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 (SIMMONS *et al.*, 2009). Vários estudos demonstram que receptores hormonais mudam rapidamente enquanto há poucas mudanças na expressão de *HER2* (WILKING *et al.*, 2007; AMIR *et al.*, 2008).

A classificação molecular do câncer de mama surgiu decorrente de trabalhos de expressão gênica com as técnicas de microarranjos, os quais forneceram informações que tornaram possível enquadrar padrões de expressão. Com isso foram definidas as chamadas “assinaturas” de genes que orientavam os prognósticos e com isso a possibilidade de otimizar os tratamentos de pacientes com câncer de mama (REIS-FILHO e PUSTZAI, 2011). O trabalho pioneiro nessa classificação molecular foi o de Perou e colaboradores (2000) que classificou os tumores mamários em quatro grupos principais de acordo com o perfil de expressão gênica apresentados, sendo

eles: HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) positivo, basal, luminal ou semelhante ao normal (*normal-like*). Posteriormente, o subtipo luminal, foi dividido em Luminal A e B (SORLIE *et al.*, 2001).

Vários estudos sugerem que devido à heterogeneidade do câncer de mama, pacientes com o mesmo diagnóstico e perfil clínico podem apresentar 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 no nível transcricional. Estudos posteriores (REIS-FILHO *et al.*, 2006; SORLIE *et al.*, 2006; MARCHIÒ *et al.*, 2008) 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. Há também dos subtipos classificados como claudina-baixo (claudinas e E-caderinas negativos), mesenquimal (vimentina positivo), Apócrino (receptor de androgênios-positivo), mioepitelial (p63 ou actina de músculo liso positivos) que são classificados com o auxílio da expressão de Ki-67 (HIRSHFIELD e GANESAN, 2014). Aproximadamente 80 a 90% dos cânceres de mama com fenótipo triplo negativo são definidos como *basal-like* quando testados, apropriadamente, para marcadores por imunistoquímica 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). Novas estratégias para o tratamento dos diferentes tipos de câncer de mama vêm sendo aplicadas tais como 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.

2.6 GENES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA DE ORIGEM SOMÁTICA

Genes-chaves (*HER2*, *COX2*, *MMP1/2*, *β-catenina*, *VEGF*, *ERp5*) medeiam a metástase e a sobrevivência das células do tumor 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, 2007; GUPTA *et al.*, 2007; MINN *et al.*, 2007).

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 reconhecida função no prognóstico das pacientes, podemos citar o oncogene *HER2* e o gene supressor de tumor *TP53* (*tumor protein p53*). O *HER2* está amplificado e/ou sua proteína superexpressa 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 (BORRESENDALE, 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). O gene *P53* mutado não teria a capacidade de controlar o ciclo celular, sendo assim a célula com dano presente poderia adquirir a capacidade de proliferação descontrolada.

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).

2.7 VIMENTINA E O GENE *VIM*

O gene *VIM* está localizado no braço curto do cromossomo 10 (10p13), também pode ser chamado de *CTRCT30* e *HEL113*. Este gene codifica a vimentina, que faz parte da classe III dos filamentos intermediários, sendo responsável pela manutenção da célula, integridade do citoplasma e estabilidade de interações que ocorrem no citoesqueleto. Sua sequência de nucleotídeos foi determinada em 1992 pelos pesquisadores Gieser e Swaroop, através de um substrato de cDNA oriundo do epitélio da retina. A vimentina, uma proteína 57 kDa, é expressa por uma gama de tipos celulares, incluindo precursores de células pancreáticas, células de Sertoli, precursores de células neuronais, células tubulares renais, macrófagos, neutrófilos, células renais estromais e leucócitos (EVANS, 2004). A vimentina é importante por ser conhecida como um bom marcador de transição epitelial-mesenquimal (THIERY, 2002), sendo amplamente reconhecida como marcador de fenótipos tipo TEM. Contudo, não é claro se o funcionamento da vimentina contribui para a expressão padrão de genes

responsáveis pelo fenótipo TEM ou se a expressão do gene *VIM* é somente um resultado da transição. Análises de mutações realizadas por Schietke *et al.* (2006) sugerem que a vimentina é uma das proteínas de filamento intermediário mais expressa em mamíferos. Em adultos, expressão de *VIM* é observada em todas as células mesenquimais dos tecidos conectivos, assim como no sistema nervoso central e nos músculos (LARSSON *et al.*, 2004).

A vimentina é seletivamente expressa em linhagens celulares de cânceres agressivos, onde é correlacionada com mudanças na TEM tais como redução da expressão de citoqueratinas e hiper-regulação de outros marcadores mesenquimais dentre os quais podemos citar as moléculas de matriz extracelular fibronectina, tenascina C, e proteoglicanos sulfatos de condroitinas (GILLES *et al.*, 2004). Vários estudos têm descrito a superexpressão de *VIM* em doenças malignas, incluindo da mama (ACKLAND *et al.*, 2003; GILLES *et al.*, 2004; KORSCHING *et al.*, 2005). A superexpressão de vimentina foi significativamente associada ao comportamento metastático de carcinoma hepatocelular (HU *et al.*, 2004). No estudo de Wei *et al.* (2008), o silenciamento de *VIM* resultou no decréscimo da invasão e metástase em cânceres de próstata. Este mesmo resultado foi encontrado em outros tipos de câncer, como de cólon e de mama (MCINROY e MAATTA, 2007). Outro estudo demonstrou que a expressão do gene que codifica a vimentina, em células epiteliais é suficiente para induzir várias características importantes na TEM, incluindo aumento da motilidade celular e alterações para o fenótipo mesenquimal (MENDEZ *et al.*, 2010). Muitas linhagens celulares de câncer de mama agressivos têm o gene *VIM* superexpresso (NEVE *et al.*, 2006; KOKKINOS *et al.*, 2007; ISERI *et al.*, 2011). O trabalho de Iseri e colaboradores (2011) observou que linhagens MCF-7 resistentes às drogas que promovem a indução de TEM apresentaram hiperexpressão de genes relacionados à transição, tais como *SLUG*, *VIM* etc. A mesma linhagem celular também apresentou hiperexpressão de *VIM* identificado por imunistoquímica no estudo de Kokkinos e colaboradores (2007). Já no estudo de Neve e colaboradores (2006) foram utilizadas 51 linhagens celulares, sendo divididas de acordo com a classificação molecular proposta inicialmente pelo trabalho de Perou e

colaboradores (2000). A expressão do gene *VIM* foi encontrada hiperexpressa no subtipo Luminal B em relação ao Luminal A.

A relação entre vimentina e E-caderina já foi avaliada em diferentes estudos, tais como o de De Craene *et al.* (2005) onde foi observado que a E-caderina hiper-regula a expressão de marcadores mesenquimais, vimentina, fibronectina e proteínas envolvidas na invasão de células cancerosas, tais como as metaloproteínases 2 e 9 (MMP2 e MMP9). A relação entre vimentina e E-caderina já foi observada em outros tipos de cânceres como no estudo de Nijkamp e colaboradores (2011) onde a baixa expressão de E-caderina concomitantemente com a alta expressão de vimentina relacionava-se com o desenvolvimento de metástases à distância em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

2.8 E-CADERINA E O GENE *CDH1*

O gene *CDH1* está localizado no cromossomo 16 (16q22.1), em uma região de aproximadamente 100 kb. Compreende 16 éxons e 15 íntrons, sendo altamente conservado entre as espécies (GALL *et al.*, 2014). Expressa uma glicoproteína de 120 kDa chamada E-caderina que consiste de domínios extracelular, citoplasmático e transmembrânico (NOLLET *et al.*, 2010). O domínio extracelular possui sítios de ligação para íons Ca^{+2} e estende-se desde a superfície da célula ligando-se às caderinas de células adjacentes por dimerização lateral (SHAPIRO *et al.*, 2000). Diminuição da expressão de *CDH1* têm sido relatadas em vários tipos de cânceres e correlacionadas às características patológicas tais como pior diferenciação tumoral, crescimento infiltrante, presença de metástases nos linfonodos e decréscimo na sobrevida do paciente (DEBIES e WELCH, 2001).

A expressão baixa de *CDH1* e conseqüentemente de E-caderina, é associada ao comportamento mais agressivo do câncer de mama (SIITONEN *et al.*, 1996; ÁSGEIRSSON *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a metilação do promotor de *CDH1* pode ser um dos mecanismos que levam a esta diminuição (NASS *et al.*, 2000; SHINOZAKI *et al.*, 2005). Nass *et al.* (2000) demonstraram que a hipermetilação da região promotora de *CDH1*

estava evidentemente aumentada em 30% dos carcinomas ductais *in situ* e em 60% em carcinomas ductais invasivos. Caldeira *et al.* (2006), encontraram metilação aberrante da ilha CpG do gene *CDH1* associada com redução dos níveis de expressão de E-caderina em câncer de mama. Neste estudo foi sugerida também a correlação entre hipermetilação de *CDH1* e a redução dos níveis de expressão de receptor de estrogênio. A metilação da região promotora desse gene também tem sua relevância em outros tipos de cânceres, como câncer gástrico, onde foi sugerido como um segundo evento genético na gênese deste câncer (GRADY *et al.*, 2000).

Vários estudos mostram mutações no gene *CDH1* como características de câncer de mama lobular (PHAROAH *et al.*, 2001; SARRIO *et al.*, 2003; BENUSIGLIO *et al.*, 2013). Por exemplo, em algumas populações (como a estadunidense) em torno de 10% dos 20 mil novos casos de carcinomas mamários que surgem todos os anos são lobulares e genotipados com mutações neste gene (WEIGELT *et al.*, 2010; MORROGH *et al.*, 2012).

2.9 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL (TEM), EXPRESSÃO DE *CDH1*, *VIM* E miRNAs RELACIONADOS

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é uma série orquestrada de eventos em que interações célula-célula e célula-matriz extracelular são alteradas para liberar as células epiteliais do tecido circundante, reorganizar o citoesqueleto para conferir a capacidade de se mover através de uma matriz extracelular tridimensional e induzir um novo programa transcricional a manter o fenótipo mesenquimal (RADISKY, 2005). A TEM é um importante processo embrionário que é também visto em tumores malignos (HAY, 2005). Células epiteliais ao sofrerem múltiplas alterações bioquímicas resultam em células de fenótipo mesenquimal, associada à perda de proteínas celulares epiteliais, sendo a principal a E-caderina (KALLURI e WEINBERG, 2009). As células mesenquimais não-polarizadas são altamente móveis e invasivas (POLYAK e WEINBERG 2009). O trabalho pioneiro de Elizabeth Hay foi o primeiro a descrever a “transformação

epitelial-mesenquimal” (HAY, 1995). O termo transformação foi substituído por “transição”, pelo fato de ser possivelmente reversível e diferente de um processo neoplásico (KALLURI e NEILSON, 2003). A TEM pode ser classificada em três subtipos diferentes, sendo eles: tipo 1, o qual seria a transição que ocorre durante a implantação, embriogênese e desenvolvimento de órgãos; tipo 2, onde a TEM é associada à regeneração de tecidos e fibroses viscerais; e tipo 3, que é associado à progressão e metástase do câncer (KALLURI e WEINBERG, 2009). Estudos com cultivo celular e em experimentos com camundongos demonstraram que células de carcinoma podem adquirir fenótipos mesenquimais e, por vezes, expressar marcadores desse estágio, tais como α -SMA (*Alpha-Smooth muscle actin*), FSP1 (*fibroblast-specific protein 1*), vimentina e desmina (YANG e WEINBERG, 2008).

Muitos fatores de transcrição estão envolvidos no processo de TEM, porém alguns deles são mais estudados, tais como SNAIL, ZEB e TWIST. O fato de serem tão estudados pode estar relacionado com a estreita relação com diferentes moduladores epigenéticos, que são fundamentais para alterações na expressão gênica. Vimentina e E-caderina (com cateninas) são conhecidas pelas suas expressões e funções específicas no *status* celular mesenquimal e epitelial, respectivamente. A expressão de vimentina aberrante durante a TEM é sugerida como sendo um elemento essencial para a plasticidade epitelial e metástase (USAMI *et al.*, 2008; DUTSCH-WICHEREK *et al.*, 2010; VUORILUOTO *et al.*, 2011). A expressão da vimentina é hiper-regulada durante a TEM, e é altamente expressa nos tumores de mama tipo basais (KOKKINOS *et al.*, 2007; SARRIO *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2010; SATELLI e LI, 2011). E-caderina é uma glicoproteína transmembrânica que medeia as adesões célula a célula dependentes de cálcio entre a maioria das células epiteliais adultas, e conseqüentemente é vital para a manutenção da estabilidade da arquitetura dos tecidos (KOKKINOS *et al.*, 2007). Por muito tempo, alterações epigenéticas que ocorriam na TEM eram associadas ao promotor de *CDH1*. A metilação desse promotor é conhecida como uma etapa que contribuirá para o processo da TEM se efetivar (LOMBAERTS *et al.*, 2006). A metilação do DNA em dinucleotídeos CpG em regiões de seqüências regulatórias é uma situação

comumente encontrada quando genes supressores de tumor estão silenciados. A metilação do promotor de *CDH1* é vista como sendo uma parte relevante no processo de TEM, sendo associada à expressão de SNAIL (CHENG *et al.*, 2011). As variações de expressão de certos genes estão sendo relacionadas à perda de E-caderina e ao ganho de vimentina (DE CRAENE e BERX, 2013).

Características de TEM têm sido observadas em câncer de mama (TRIMBOLI *et al.*, 2008), cólon (BRABLETZ *et al.*, 2005), ovário (VERGARA *et al.*, 2009) e em modelos de cânceres esofágicos (USAMI *et al.*, 2008). Trabalhos em câncer de mama e outros tipos postulam a TEM como um potencial mecanismo pelo qual células epiteliais de tumores adquirem maior motilidade e fenótipo invasivo e escapam do tumor primário (GUARINO *et al.*, 2007). No câncer de mama, assim como em outros cânceres, raramente a TEM ocorre homogeneamente em todo o tumor. As exceções incluem carcinoma lobular difuso, onde a E-caderina é perdida uniformemente pelo tumor e os perfis de expressão gênica identificam genes envolvidos na TEM incluindo hiper-regulação de fibronectina e colágeno tipos I e III (TURASHVILI *et al.*, 2007). A oncogenicidade da TEM é associada à perda da polaridade ápico-basal (OZDAMAR *et al.*, 2005), desintegrações das junções oclusivas e aderentes, alterações no citoesqueleto, incluindo hiporegulação de citoqueratinas e hiper-regulação de vimentina (KOKINNOS *et al.*, 2007), aquisição da motilidade e fenótipo invasivo.

Uma das principais características da TEM é a combinação da perda de contato célula-célula, redução da expressão de E-caderina, e aumento da expressão de marcadores mesenquimais, tais como vimentina (GUARINO *et al.*, 2007; TRIMBOLI *et al.*, 2008). Vários indutores chave de TEM são fatores de transcrição que reprimem a expressão de *CDH1* que é considerado um supressor de tumor. Concomitantemente com a perda de adesão de células epiteliais e componentes do citoesqueleto, células em TEM adquirem expressão de componentes mesenquimais e manifestam fenótipo migratório. A perda da expressão de *CDH1* aumenta a invasividade de células tumorais *in vitro* e contribui para a transição de adenoma para carcinoma em modelos animais (THIERY, 2002). Lombaerts *et al.* (2006) observaram que TEM ocorre somente em células de carcinomas mamários

com hipermetilação no promotor de *CDH1* e não com inativação mutacional o que indica uma função importante da perda de E-caderina como evento primário ou inicial da TEM.

Estudo em linhagens celulares de câncer de mama mostram redução nos níveis de citoqueratinas, redução ou mesmo ausência de componentes celulares, tais como a E-caderina, desmoplaquina e ZO-1 (THOMPSON *et al.*, 1992; SOMMERS *et al.*, 1994). Alguns fatores como fator de crescimento epidermal (FCE), superexpressão do fator do receptor do fator de crescimento tipo 1 de insulina (IGF-IR), hiporegulação de E-caderina, e altos níveis de NGF- $\kappa\beta$ podem desencadear a TEM em linhagens celulares MCF10A (KIM *et al.*, 2007). A linhagem celular PMC42, derivada de câncer de mama, é muito utilizada para determinar marcadores de TEM por responder muito bem a alterações nos níveis de expressões de *VIM* e *CDH1*, o que auxilia na compreensão dos estágios da TEM (WHITEHEAD *et al.*, 1983; WHITEHEAD *et al.*, 1984). As análises de arranjos dos genes das linhagens celulares são muito importantes para o estudo da TEM. Os trabalhos de Zajchowski *et al.* (2001) confirmaram associação entre o padrão mesenquimal e a invasividade das células cancerosas.

Estudos relatam a relação entre a perda da expressão de *CDH1* e a progressão do câncer. A perda de *CDH1* é um marcador de carcinomas lobulares de mama, que correspondem a cerca de 10% de todos os cânceres de mama invasivos. São caracterizados por um genótipo apresentando mutação em *CDH1*, diferentemente dos carcinomas ductais que apresentam tipicamente *CDH1* não mutado (WEIGELT *et al.*, 2010; MORROGH *et al.*, 2012) e são conhecidos por ter uma pior resposta às terapias neoadjuvantes.

Moelans *et al.* (2009), mostraram que a perda da expressão deste gene é mais frequente em tumores primários de mama que levam a metástases no fígado e pele do que àqueles que levavam às metástases no cérebro ou pulmão.

Outros mecanismos que levam a perda da função de E-caderina incluem a metilação de *CDH1* (MORROGH *et al.*, 2012). As mutações de *CDH1* ou perda da expressão da E-caderina por outros mecanismos, são considerados alvos nas terapias anticâncer (TANG *et al.*, 2012).

Os microRNAs (miRNAs), sequências não codificantes expressos de forma endógena com aproximadamente 22 nucleotídeos (CAI *et al.*, 2009), são conhecidos por serem potenciais modificadores da expressão gênica, fazendo com que a célula responda rapidamente às alterações no ambiente. Muitos desses miRNAs estão sendo associados direta ou indiretamente com a TEM (ZHANG e MA, 2012).

Algumas famílias de miRNAs são importantes por interagirem com moléculas relacionadas à TEM, tais como os membros da família miR-34 os quais estão relacionados com o processo de TEM dependente de SNAI1 (KIM *et al.*, 2011). Alguns membros da família miR-200 são descritos como hiporegulados em células troncos de cânceres malignos de próstata, cólon, mama (SHIMONO *et al.*, 2009; WELLNER *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2010).

A promoção da motilidade e invasividade de célula de carcinoma já foi observada como resultado do aumento da expressão de miR-92a acompanhado da redução da expressão de *CDH1* (CHEN *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A Transição Epitelial Mesenquimal (TEM) é um processo normal em vários momentos fisiológicos, mas utilizado pelas células cancerosas para adquirir mobilidade e invadir tecidos adjacentes e/ou distantes. Além das alterações na forma e aquisição de mobilidade, ocorrem mudanças fundamentais no perfil de expressão das células. A modificação mais significativa é a repressão de E-caderina (codificada pelo gene *CDH1*) e indução de vimentina (codificada pelo gene *VIM*). Apesar de estas modificações serem conhecidas e bem definidas em vários tipos de câncer, os mecanismos subjacentes que regulam a expressão destes genes são estudados de forma fragmentada. Neste estudo, propomos o estudo mais amplo, avaliando a expressão gênica (RNAm) e dois dos mecanismos que poderiam interferir no nível de expressão (número de cópias, e regulação epigenética (metilação de promotor)) nas mesmas amostras e em diferentes estágios (tecido mamário normal, carcinomas primários de mama e linfonodos metastáticos). Desta forma, o estudo traz contribuições para a compreensão deste processo assim como para a utilização da expressão destes genes marcadores como indicadores de prognóstico da doença.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os genes *CDH1* e *VIM* em relação à expressão, número de cópias e metilação na região promotora, visando contribuir para uma melhor compreensão da regulação destes genes na TEM e na progressão dos carcinomas primários de mama.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do RNAm dos genes *CDH1* e *VIM* em amostras de tecido mamário não tumoral, carcinomas primários de mama e linfonodos metastáticos.
- Avaliar o número de cópias dos genes alvos relacionando com os dados encontrados nos estudos de expressão.
- Avaliar a porcentagem de metilação dos promotores dos genes *CDH1* e *VIM*, correlacionando com o nível de expressão.
- Avaliar os subgrupos de acordo com os parâmetros clínicos e histopatológicos verificando se há relação entre os mesmos e os padrões de expressão, de número de cópias e de metilação da região promotora dos genes em estudo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras foram coletadas no momento da cirurgia para remoção do tumor após o diagnóstico de câncer de mama, no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) Curitiba, Paraná, após assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido (estudo aprovado pelo CONEP sob o registro 7220) (ANEXO I). Todas as amostras foram provenientes de pacientes do sexo feminino e a idade média foi de $55,9 \pm 15,5$. Foram analisadas 15 amostras não tumorais (tecido mamário adjacente ao tumor, coletado do quadrante oposto e fora da margem de segurança), 137 amostras de tumor e 28 de linfonodos. Após a coleta, o material foi mantido em tubos contendo *RNAlater*[®] (*Ambion Inc. Applied Biosystems*) para garantir a preservação do RNA até o momento da sua extração. Posteriormente, o material seguiu para processamento manual onde o material excedente (gordura, vasos sanguíneos) foi removido viabilizando a amostra para o estudo. O material foi estocado a -80°C até o momento da extração de ácidos nucleicos.

Na Tabela 1 estão as informações relativas à caracterização da amostra de tumores e linfonodos (idade das pacientes, classificação, marcadores tumorais etc.) assim como quais amostras foram estudadas em cada um dos ensaios (expressão, número de cópias e metilação).

TABELA 1 - Caracterização da amostra de tumores mamários

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EMLN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR*	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
1	65	III	40	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
2	95	III	40	A	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
3	41	II	45	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
4	42	III	50	A	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	-	-	X	-
5	47	II	30	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	-	-	X	-
6	90	II	65	P	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
7	45	II	60	P	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	-	-	X	-
8	58	I	20	A	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
9	46	II	48	P	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
10	88	III	50	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
11	50	III	70	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
12	79	I	40	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
13	50	II	15	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
14	59	III	17	P	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
15	49	III	25	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
16	70	II	23	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
17	43	III	20	A	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
18	51	II	30	A	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	-	-	X	-
19	47	II	17	A	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
20	56	III	28	P	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EM LN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
21	48	II	55	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
22	70	I	40	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
23	53	II	16	A	NEG	NEG	POS	HER2	VIM	-	-	X	-
24	40	III	32	A	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
25	74	I	15	A	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
26	54	II	40	P	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
27	66	I	17	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
28	40	II	30	P	POS	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	X	-
29	40	II	30	P	POS	-	-	-	VIM	-	-	X	-
30	72	III	35	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	-	-	X	-
31	56	II	20	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
32	44	-	-	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	-	-	X	-
33	55	III	19	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	-	-	X	-
34	50	II	50	P	POS	-	-	-	VIM	-	-	X	-
35	63	II	30	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
36	56	II	40	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
37	51	III	20	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
38	47	III	30	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
39	75	III	27	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
40	42	I	25	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EM LN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
41	39	III	25	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	-	-	-	-
42	65	III	41	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
43	89	II	35	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	-	X	-
44	37	III	30	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	-	-	X	-
45	45	III	57	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	-	-	X	-
46	44	II	25	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
47	82	II	29	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
48	52	III	90	P	NEG	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
49	60	I	13	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	X	X	-
50	61	II	40	P	POS	POS	POS	LB	CDH1	-	X	X	-
51	44	II	30	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
52	62	III	20	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	-	X	X	-
53	70	-	40	P	POS	POS	POS	LB	CDH1	-	-	X	-
54	61	I	35	P	NEG	POS	NEG	?	CDH1/VIM	-	X	X	-
55	76	II	40	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1	-	-	X	-
56	97	-	-	-	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
57	56	II	37	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	X	X	X	-
58	33	II	40	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-
59	44	II	50	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
60	56	II	27	P	POS	POS	NEG	LA	VIM	X	-	X	-
61	47	I	25	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1	X	-	X	X
62	62	II	15	A	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	-	X	-

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EM LN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
63	45	II	35	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	-
64	72	II	35	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	X	X	-
65	67	II	5	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
66	66	I	20	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	X	X	-
67	67	III	50	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	-
68	44	II	18	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	-
69	57	II	20	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	-	X	-
70	72	II	24	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-
71	57	II	30	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-
72	60	II	75	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1	X	-	X	-
73	45	I	5	A	POS	POS	POS	LB	CDH1	X	-	X	-
74	62	I	20	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	X	-
75	49	II	25	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1	X	-	X	-
76	32	II	25	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	X	X	X	X
77	49	II	40	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
78	71	I	10	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
79	45	II	22	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	X	X	X
80	74	III	35	A	NEG	POS	NEG	?	CDH1/VIM	X	-	-	-
81	81	II	20	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	-	-
82	73	II	32	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	-
83	46	III	40	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	X

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EM LN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
84	45	I	6	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	-	-
85	39	II	18	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	-
86	89	III	60	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	X	X	X	X
87	39	II	80	P	NEG	NEG	-	?	CDH1/VIM	X	X	X	-
88	52	II	20	P	POS	POS	POS	LB	CDH1	X	-	-	-
89	61	II	20	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	-	X
90	73	I	8	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	-	-
91	59	II	15	II	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	X	X
92	84	III	35	P	NEG	POS	POS	?	CDH1/VIM	X	X	X	-
93	81	II	40	A	POS	POS	NEG	LA	VIM	X	-	X	-
94	58	II	17	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	-	-
95	42	II	30	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
96	34	III	45	P	NEG	NEG	-	?	CDH1/VIM	X	X	-	-
97	50	II	80	P	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	X	X	-
98	34	II	60	A	POS	POS	NEG	LA	VIM	X	-	X	-
99	59	-	15	II	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	-	X
100	-	III	25	-	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	-	-	-
101	39	III	12	P	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	X	X	-
102	51	II	20	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
103	26	-	60	-	-	-	-	-	CDH1/VIM	X	-	X	X
104	78	III	25	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EM LN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
105	38	II	14	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
106	65	I	22	A	POS	POS	-	?	CDH1/VIM	X	-	X	
107	71	II	14	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
108	44	III	65	P	-	-	-	-	CDH1/VIM	X	X	X	-
109	82	II	14	A	POS	POS	-	?	CDH1	X	-	X	-
110	50	II	30	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-
111	-	-	-	-	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	X
112	27	II	-	P	POS	NEG	POS	LB	VIM	X	-	X	-
113	66	III	-	A	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	-	X	X
114	58	II	-	A	POS	NEG	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	X	-
115	38	II	-	A	NEG	NEG	-	?	CDH1/VIM	X	-	X	-
116	34	II	-	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1	X	-	-	-
117	80	II	-	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1	X	-	X	-
118	42	II	-	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	-	-
119	82	I	15	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-
120	48	II	15	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	-	X	-
121	78	III	20	A	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	-	X	-
122	58	II	15	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	X	-
123	70	II	30	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	X	-
124	66	I	10	A	POS	NEG	-	?	CDH1/VIM	X	-	X	-
125	53	III	-	P	NEG	NEG	POS	HER2	CDH1/VIM	X	X	X	-

AMOSTRA	IDADE	GRAU	TAMANHO (mm)	METÁSTASE EM LN	RE	RP	HER2	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	ALVO	EXPRESSION (SP)	EXPRESSION (LN)	VNC	METILAÇÃO
126	38	II	-	P	POS	POS	NEG	LA	CDH1/VIM	X	X	X	-
127	44	II	13	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	X	X
128	51	I	-	A	POS	NEG	-	?	CDH1/VIM	X	-	X	-
129	48	-	-	-	POS	POS	-	?	CDH1/VIM	X	-	X	X
130	44	II	-	P	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	-	X	X	-
131	58	I	-	A	POS	POS	POS	LB	VIM	-	-	-	-
132	49	I	-	A	POS	POS	POS	LB	CDH1/VIM	X	-	-	-
133	41	-	-	P	NEG	NEG	NEG	TN	CDH1/VIM	X	X	X	-
134	52	I	-	A	POS	POS	NEG	LA	CDH1	-	-	X	-
135	76	II	-	P	-	-	-	-	VIM	X	-	X	X
136	63	-	-	-	-	-	-	-	VIM	X	-	X	-
137	50	II	35	P	POS	POS	-	?	CDH1/VIM	X	X	X	X

Legenda: A – ausência de metástase nos linfonodos axilares; P – presença de metástases nos linfonodos axilares; I – grau histológico I; II – grau histológico II; grau histológico III; RE – Receptor de estrogênio; RP; receptor de progesterona; HER2 – Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2; mm – milímetros; SP – sítio primário; LN – linfonodo; POS – positivo; NEG – negativo; VNC – variação do número de cópias; - – dado não encontrado ou avaliado; LA – luminal A; LB - luminal B; TN – triplo negativo; HER2 – HER2 positivo; ? – classificação molecular não pode ser definida. X – estudo realizado. *A classificação molecular se baseou na classificação imunohistoquímica conforme Goldhirsch (2011).

5.2 EXPRESSÃO DE RNAm

5.2.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E OBTENÇÃO DE cDNA

A extração do RNA total das amostras tumorais, não tumorais e de linfonodos foi realizada com o *kit* de extração *RNAeasy*[®] (Qiagen). Aproximadamente 0,03 g de tecido de cada amostra foram utilizados e a extração ocorreu conforme as recomendações do fabricante. A verificação da integridade do material foi obtida através de eletroforese em gel de agarose a 2,0%, utilizando-se em torno de 10 ng do RNA extraído. Após a determinação das concentrações dos RNAs de cada amostra foram preparadas as soluções de trabalho a 120 ng/μl. Posteriormente, ocorreu a retrotranscrição de 1200 ng de RNA para 20 μl de volume final (60 ng/μl) para a síntese de DNA complementar (cDNA) com a utilização do *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Ao final, foram adicionados 140 μl de água ultrapura à reação de retrotranscrição, para uma concentração final de 7,5 ng/μl.

5.2.2 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A análise da expressão gênica foi realizada por Quantificação Relativa através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (XIA *et al.*, 2010). Neste método obtemos a expressão de determinado gene alvo estabelecendo uma relação com uma amostra de referência a qual foi escolhida por ter apresentado menor variação e ciclo de *threshold* (Ct) semelhantes aos controles endógenos, lembrando que nos valores de cálculos essa amostra assume valor 1. As eficiências de 100% das amostras são garantidas pelo fabricante das sondas *Taqman (Applied Biosystems)* isentando a necessidade da curva-padrão. As reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas no equipamento *VIIA7 (Applied Biosystems)* utilizando o sistema de detecção por sonda de hidrólise fluorescente *Taqman[®]FAM-MGB* (com QNF). As reações na placa de RT-qPCR seguiram o protocolo *TaqManGene Expression Assays* e o *Taqman Universal PCR Master Mix (Applied*

Biosystems). Para cada amostra foram realizadas triplicatas com volume final de 10 µl para cada reação. A mesma foi composta por 0.5 µl de TaqMan Gene Expression Assay (20x), 5 µl de TaqMan Gene Expression Master Mix (2x), 2 µl de cDNA molde (7,5 ng/µl) e 2 µl de água livre de RNase.

As reações de RT-qPCR foram sempre acompanhadas de dois genes de referência, ou seja, genes que possuem expressão constitutiva para esse tipo de tecido. É de suma importância a validação dos genes de referência para cada tipo de experimento. Nosso laboratório adota como genes de referência para trabalhos com câncer de mama os genes *GAPDH* e *ACTB*. A forma como os genes foram validados está em anexo (ANEXO II).

5.3 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS

5.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de câncer de mama foram submetidas ao método de fenol-clorofórmio para extração do DNA. Os fragmentos de tumores sólidos foram digeridos em 130 µl de tampão de proteinase K e 70µl de proteinase k 10 µg/ml durante incubação em banho-maria a 55°C por 24 horas. Em seguida, a inativação da proteinase K ocorreu através da inclusão dos tubos em banho seco a 95°C por 10 minutos. Duas lavagens subsequentes com adição de 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 v/v, seguido de homogeneização no vórtex por 15 segundos e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Ao sobrenadante resultante foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5 M e o tubo foi mantido no freezer -20°C por 24 horas. Decorrido o tempo, foi realizada a centrifugação novamente a 14.000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e o material restante seguido para lavagem com 1 ml de etanol 70% e centrifugação à mesma velocidade dos passos anteriores, por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA ressuspendido em 40µl de água ultrapura.

Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20°C. A leitura da concentração de DNA foi realizada

utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade). Apenas foram consideradas para as análises moleculares as amostras que apresentaram razão A260nm/A280nm com valor aproximado de 1,8 a 2,0, conforme instruções do fabricante.

5.3.2 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Para a avaliação do número de cópias dos genes *CDH1* e *VIM* foram utilizados ensaios *TaqMan® Copy Number Assays (Life Technologies™)*. Essa metodologia é baseada em uma reação dupla de PCR em tempo real que detecta a sequência do gene alvo do estudo e a sequência de um gene de referência (*RPPH1* – gene da RNase P) conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diplóide. Este método de detecção relativa é usado para determinar o número de cópias do gene de interesse em um DNA genômico, normalizado com o número de cópias do DNA de referência. Em todas as placas, contendo as amostras tumorais, foi incluído DNA controle (calibrador) com o número de cópias dos genes de interesse conhecido proveniente de 10 mulheres sem câncer de mama de diferentes origens étnicas (Brasil, Índia, China, México e Estados Unidos), assim como um controle negativo. O material genômico de diferentes etnias foi utilizado a fim de minimizar os efeitos normais da variação do número de cópias interindividual. Para cada reação foram utilizados: 5µl de *master mix*, 2µl de DNA (na concentração de 5ng/µl), 0,5 µl de *mix* do gene em estudo (contendo o par de iniciadores (*primers*) e a sonda TaqMan®), 0,5 µl de *mix* do gene da *RNASE P* (*primers* e sonda TaqMan®) e 2 µl de água ultrapura, totalizando 10µl de volume de reação. Todas as amostras, incluindo o DNA controle foram analisadas em triplicata na placa. O equipamento utilizado foi o *VIIA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)*. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As análises foram realizadas utilizando-se o *software Copy Caller (Life Technologies™)*. Não foram consideradas amostras que apresentaram valor de CT > 33 ciclos e valor de z-score ≥ 2.65, pois esses valores podem induzir

a erros de interpretação, visto que normalmente estão associados a artefatos de técnica ou degradação de material. O número de cópias do DNA teste foi calculado pelo método da quantificação relativa: $2^{-\Delta\Delta CT}$ multiplicado por 2 (indivíduos diploides). Este método foi adotado devido à padronização prévia dos ensaios de *primers* e sondas comercializados pela empresa, o que garante uma eficiência de reação de 100%, possibilitando que as curvas de amplificação entre os genes testados e o gene de referência possam ser comparadas com precisão. Para efeito de análise, foram consideradas normais as amostras que apresentaram número de cópias entre 1,5 e 2,5; com perdas aquelas com número inferior a 1,5 e com ganhos aquelas com número superior a 2,5.

GENE E INICIADORES	CÓDIGO/SEQUÊNCIA	ANÁLISE
<i>CDH1</i>	Hs01023894_m1	Expressão gênica
<i>VIM</i>	Hs00958111_m1	Expressão gênica
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1	Expressão gênica
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	Expressão gênica
<i>CDH1</i>	Hs05460491_cn	Número de cópias
<i>VIM</i>	Hs02396379_cn	Número de cópias
<i>RNAseP</i>	Hs05126807_cn	Número de cópias
<i>CDH1-F</i>	CTGTTGGTTTCGGTGAGCA	Análise de metilação
<i>CDH1-R</i>	TTTCCAACCCCTCCCTACTC	Análise de metilação
<i>VIM-F</i>	CCTCCTACCGCAGGATGTT	Análise de metilação
<i>VIM-R</i>	GAGAAGTCCACCGAGTCCTG	Análise de metilação

QUADRO 1: GENES E INICIADORES UTILIZADOS REFERENCIADOS PELOS SEUS CÓDIGOS DISPONIBILIZADOS PELO FABRICANTE E RESPECTIVOS ENSAIOS.

FONTE: O autor, 2017.

5.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *CDH1* E *VIM*

A análise do *status* de metilação da região promotora dos genes *CDH1* e *VIM* foi realizada em 23 amostras pelo método de MSRE-qPCR. O DNA foi obtido conforme descrito no item 5.3.1. Nesta etapa, 150ng de DNA genômico foi digerido com 30U da enzima sensível à metilação *HpaII* em um volume final de 30 μ l. Em paralelo, uma alíquota contendo a mesma quantidade de DNA genômico também foi tratada sob as mesmas condições, mas sem adição de enzima (*sham*) (QUADRO 2).

Componente da Reação	Tubo teste	Tubo controle (<i>sham</i>)
Água ultra-pura estéril	8,7 μ l	11,7 μ l
Tampão da enzima (10X)	3 μ l	3 μ l
Enzima (10U/ μ l)	3 μ l	-
BSA	0,3 μ l	0,3 μ l
Amostra (150 ng em 15 μ L)	15 μ l	15 μ l
Volume final	30μl	30μl

QUADRO 2: REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO.

FONTE: O autor, 2017.

As reações foram incubadas a 37°C por cerca de 18 horas seguidas de 10 min a 65°C para inativação da enzima. Como amostras controles, foram utilizadas duas linhagens celulares com perfis de metilação conhecidos e garantidos pelo fabricante. A linhagem HeLa (100ng/ μ l) (CpG Methylated HeLa Genomic DNA – New England Biolabs®) foi utilizada como controle hipermetilado, e para o controle hipometilado foi utilizado o Epiect Control (50ng/ μ l) (Unmethylated human control DNA – Qiagen).

Os produtos finais das digestões (amostras digeridas *com HpaII* e não digeridas) foram utilizados na PCR em tempo real em replicatas no equipamento VIIA7 (*Applied Biosystems*). Os componentes da reação submetida à PCR em tempo real foram: 2.9 μ l de água ultra-pura, 5 μ l de SYBR *master mix* (Qiagen®), 0,05 μ l de *primer forward* (a jusante) (10nM), 0,05 μ l (10nM) de *primer reverse* (a montante) e 2 μ l de amostra, totalizando 10 μ l de volume final para cada replicata. As condições da PCR foram 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por

15 segundos e posteriormente 60° por 1 minuto. Para cada placa foram realizadas curvas de anelamento a 60°C - 95°C, com aumentos de 0,3°C para garantir um único pico e assim a especificidade dos iniciadores. Para a análise da metilação, a média do valor de Ct (*threshold cycle*) das amostras digeridas foi subtraída da média do valor de Ct das amostras não digeridas (sham) para a determinação do ΔCt para cada produto de PCR. A fórmula utilizada para o cálculo de percentual de metilação foi $0,5^{-\Delta Ct}$ (GOMES, GOMES E RAMOS, 2007).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados obtidos na análise de expressão gênica, foram realizados testes de normalidade entre os grupos amostrais, seguido do teste de Mann-Whitney ou teste *t* com correção de Welch's através do *software GraphPad Prism version 6.01 para Windows* (Disponível em: www.graphpad.com), e STATISTICA.

Os dados de variação do número de cópias foram avaliados pelo teste de qui-quadrado para verificar se havia variação significativa entre os grupos perda (valores inferiores a 1,5), normal (valores entre 1,5 a 2,5) e ganho (valores superiores a 2,5 cópias). Os valores absolutos (aqueles que não foram separados em grupos) também foram avaliados através do teste *t* com correção de Welch's com o auxílio do *software* STATISTICA.

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise de expressão dos genes *CDH1* e *VIM* foi realizada em 15 amostras não tumorais, com a finalidade de verificar o comportamento dos genes alvos e comparar sua expressão com a doença em seus diversos estágios. As 15 amostras (idade média de 55,5±18,4) foram testadas para ambos os genes alvos onde apresentaram valores médios de expressão de 1,35±1,29 para *CDH1* e 1,46±0,70 para *VIM* (QUADRO 3).

A análise em tumores foi realizada em 61 e 65 amostras e resultou em uma expressão média de 2,85±19,40 para *CDH1* e 0,81±26,69 para *VIM*, respectivamente. A média de idade das pacientes analisadas foi de 55,9±15,5. Os dados obtidos encontram-se nos quadros abaixo (QUADROS 4 e 5). Os dados provenientes das amostras foram testados para verificar a normalidade indicando o tipo de teste mais adequado (ANEXO III). Amostras que apresentaram valores extremos (8 amostras de *CDH1* e 1 amostra de *VIM*) que interferiam na média (valores superiores a 10 de *fold change*) foram retiradas das análises estatísticas, porém mantidas na discussão.

QUADRO 3: VALORES DE EXPRESSÃO DE AMOSTRAS NÃO TUMORAIS PARA O GENE *CDH1* E *VIM*

AMOSTRAS NT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
FC (<i>CDH1</i>)	1,803	1,428	0,634	0,066	1,456	0,536	0,159	0,069	2,325	1,033	2,784	0,03	3,652	1,519	2,875
FC (<i>VIM</i>)	0,180	0,690	0,470	0,280	0,430	0,660	0,350	1,520	2,900	1,320	0,160	1,30	1,060	1,02	0,70

Legenda: NT, não tumorais; FC, *fold change*.

FONTE: O autor, 2017.

Amostras	FC	Amostras	FC	Amostras	FC	Amostras	FC	Amostras	FC
1	89,401	14	17,902	27	1,138	40	5,209	53	0,519
2	1,428	15	1,317	28	0,085	41	2,87	54	1,965
3	1,033	16	0,486	29	3,719	42	0,516	55	5,284
4	0,41	17	0,943	30	59,348	43	3,525	56	1,594
5	0,393	18	1,806	31	0,634	44	2,804	57	23,014
6	2,784	19	4,652	32	0,45	45	0,061	58	0,424
7	2,87	20	0,003	33	8,608	46	0,823	59	0,537
8	0,492	21	0,536	34	0,468	47	17,885	60	0,103
9	3,301	22	0,528	35	0,069	48	8,84	61	2,914
10	2,145	23	12,365	36	0,159	49	1,768		
11	0,688	24	0,616	37	21,049	50	0,274		
12	1,803	25	6,43	38	2,471	51	45,723		
13	2,875	26	0,08	39	0,066	52	0,668		

QUADRO 4: VALORES DE EXPRESSÃO DE AMOSTRAS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS PARA O GENE *CDH1*

Legenda: FC, *fold change*

FONTE: O autor, 2017.

Amostras	FC	Amostras	FC	Amostras	FC	Amostras	FC	Amostras	FC
1	0,514	14	0,573	27	0,715	40	0,412	53	0,165
2	0,955	15	0,146	28	0,264	41	0,242	54	0,296
3	0,188	16	0,232	29	0,596	42	1,108	55	0,252
4	0,184	17	0,265	30	0,685	43	0,358	56	0,521
5	0,366	18	0,640	31	0,670	44	0,164	57	0,263
6	0,066	19	0,075	32	0,307	45	0,213	58	12,678
7	0,036	20	0,981	33	0,091	46	2,756	59	0,365
8	2,078	21	1,355	34	0,311	47	0,435	60	0,357
9	0,126	22	1,112	35	0,081	48	0,166	61	0,143
10	0,062	23	0,678	36	0,428	49	0,356	62	0,263
11	0,956	24	0,581	37	4,807	50	0,154	63	0,078
12	9,506	25	0,305	38	0,032	51	0,048	64	0,234
13	0,155	26	0,414	39	2,134	52	0,151	65	0,251

QUADRO 5: VALORES DE EXPRESSÃO DE AMOSTRAS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS PARA O GENE *VIM*

Legenda: FC, *fold change*.

FONTE: O autor, 2017.

A figura 1 mostra a diferença entre os valores de expressão dos genes *CDH1* e *VIM* em amostras de carcinomas mamários, onde a expressão do gene *CDH1* foi 3,5 vezes maior do que a expressão de *VIM*, sendo estatisticamente significativo. As figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentam os gráficos cujos resultados estão explicitados na tabela 2.

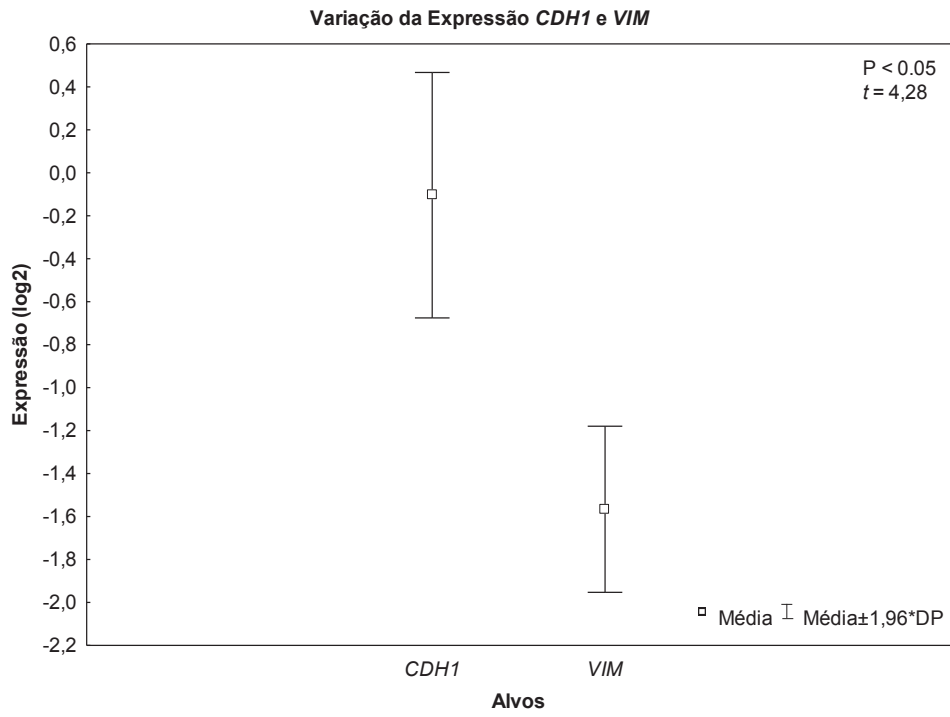


FIGURA 1 –DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* NO SÍTIO PRIMÁRIO.

Considerando a idade e os dados histopatológicos, as pacientes foram separadas em grupos e os dados foram analisados para ambos os genes *CDH1* e *VIM*. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 2. Dados relativos à expressão gênica dos genes *CDH1* e *VIM* e características clínico-patológicas.

Grupos	<i>CDH1</i> (FC)	N	P	<i>VIM</i> (FC)	N	P
LN+	1,09	20	0,78	0,54	29	0,72
LN-	1,20	41		0,82	34	
Grau I e II	1,19	51	0,21	0,73	53	0,42
Grau III	0,78	10		0,43	15	
RE+	1,25	41	0,27	0,75	55	0,73
RE-	0,92	11		0,39	16	
RP+	1,30	41	0,46	0,77	42	0,93
RP-	0,81	11		0,37	12	
HER2+	1,76	10	0,22	0,97	19	0,85
HER2-	0,67	34		0,59	39	
Abaixo de 50 anos	0,96	22	0,43	0,90	22	0,02*
50 anos ou mais	0,78	32		0,51	35	

Legenda: LN-, ausência de metástase nos linfonodos axilares; LN+, presença de metástase nos linfonodos axilares; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; FC, *fold change*; N, número de indivíduos analisados; P, valor de significância; *, valor estatisticamente significativo.

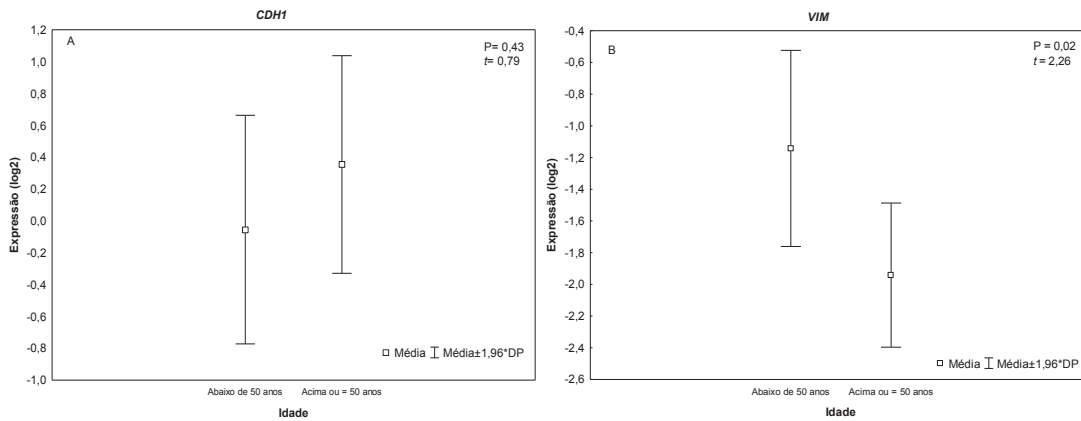


FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* e *VIM* REFERENTE À IDADE DAS PACIENTES. (A) Comparação entre pacientes com idade abaixo de 50 anos e igual ou superior a 50 anos para o gene *CDH1*. (B) Comparação entre pacientes com idade abaixo de 50 anos e igual ou superior a 50 anos para o gene *VIM*.

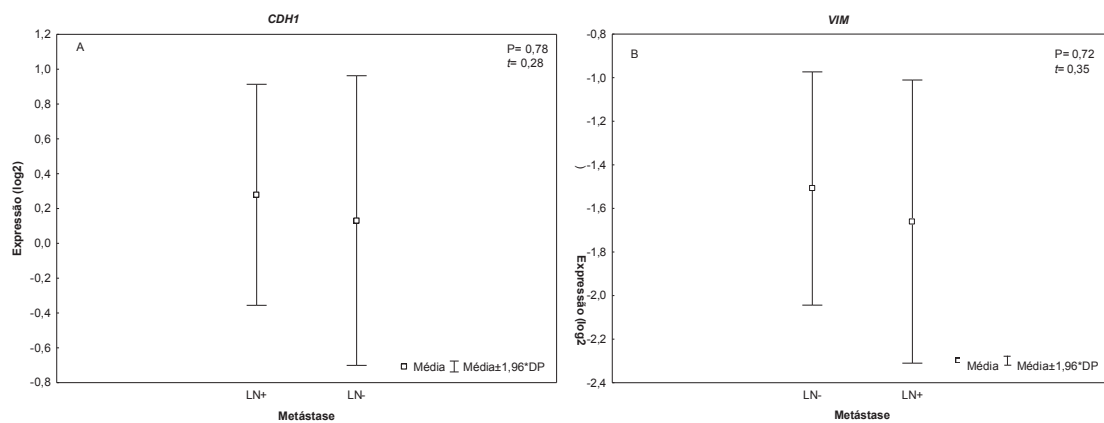


FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* e *VIM* REFERENTE À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASES EM LINFONODOS. (A) Comparação dos valores de expressão dos grupos com presença e ausência de metástase nos linfonodos para o gene *CDH1* (B) Comparação dos valores de expressão dos grupos com presença e ausência de metástase nos linfonodos para o gene *VIM*.

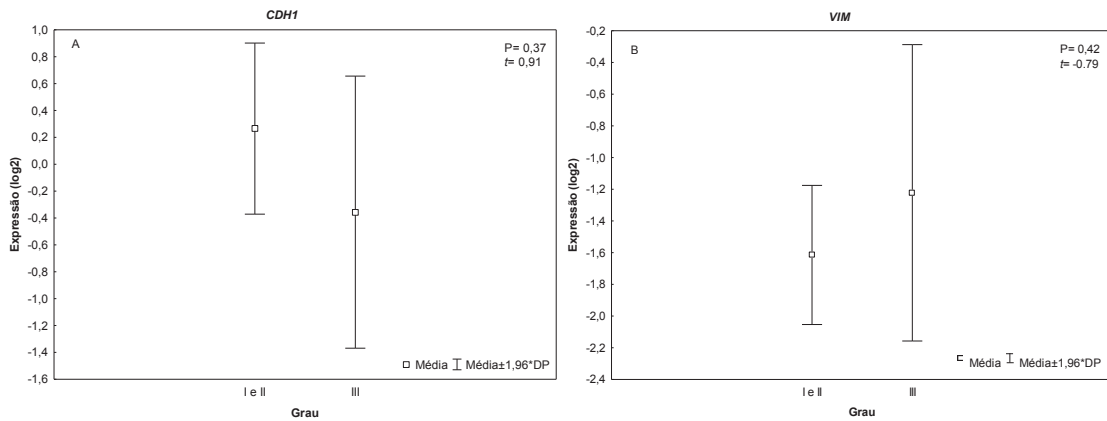


FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* e *VIM* REFERENTE AO GRAU DO TUMOR. (A) Comparação de valores obtidos entre os grupos de grau I e II versus grau III para o gene *CDH1*. (B) Comparação de valores obtidos entre os grupos de grau I e II versus grau III para o gene *VIM*.

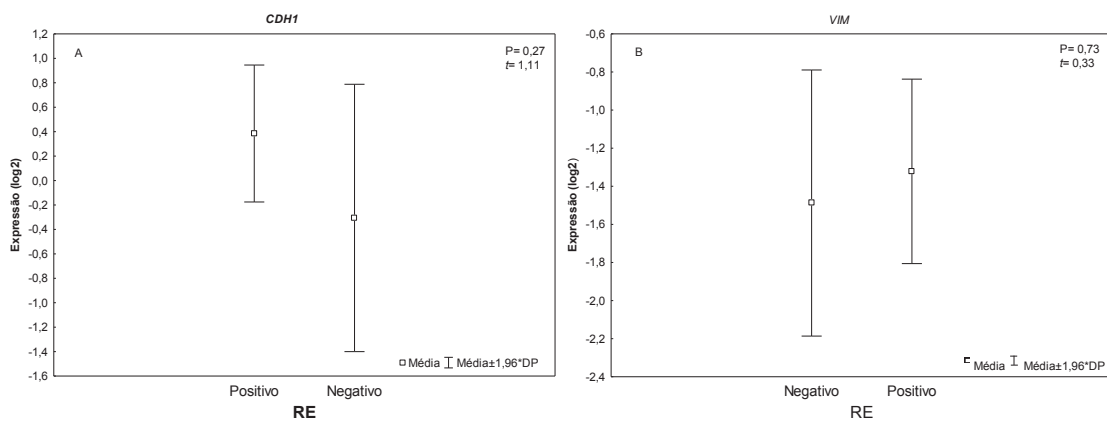


FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* e *VIM* REFERENTE AO RECEPTOR DE ESTRÓGENO. (A) Comparação dos valores de expressão de pacientes com RE+ e RE- em relação ao gene *CDH1*. (B) Comparação dos valores de expressão de pacientes com RE+ e RE- em relação ao gene *VIM*.

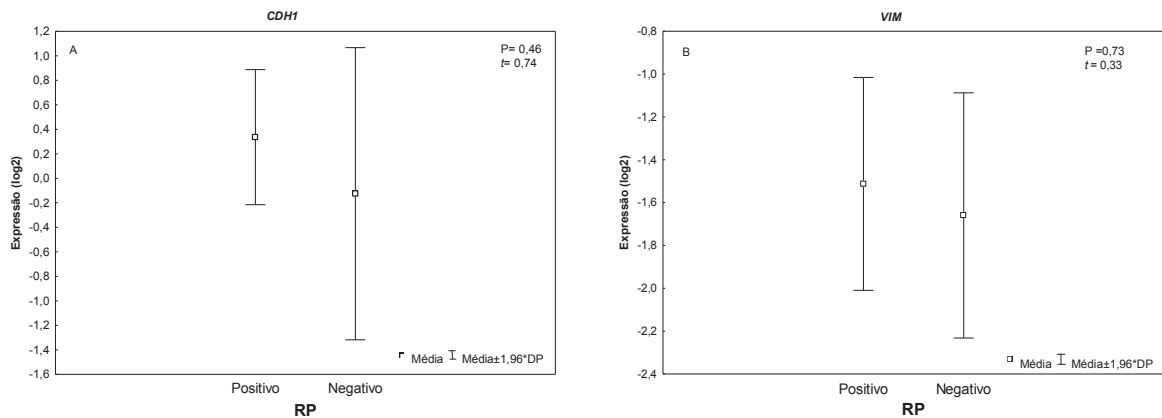


FIGURA 6. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE AO RECEPTOR DE PROGESTERONA. (A) Comparação dos valores de expressão de pacientes com RP+ e RP- para o gene *CDH1*. (B) Comparação dos valores de expressão de pacientes com RP+ e RP- para o gene *VIM*.

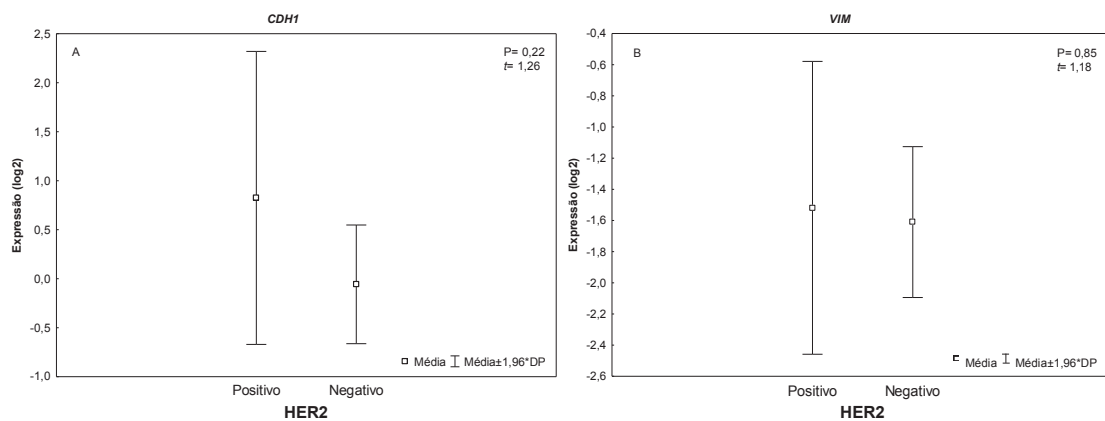


FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CDH1* E *VIM* REFERENTE AO RECEPTOR HER2. (A) Comparação entre grupos com HER2+ e HER2- em relação ao gene *CDH1*. (B) Comparação entre grupos com HER2+ e HER2- em relação ao gene *VIM*.

De acordo com a expressão dos três marcadores principais (RE, RP e HER2) na análise imunohistoquímica, os pacientes foram classificados nos subgrupos moleculares Luminal A (RE+, RP+, HER2-), Luminal B (RE+, RP+, HER2+), HER2 (RE-, RP-, HER2+) e triplo negativo (RE-, RP-, HER2-), conforme Goldhirsch (2011). A figura 8 demonstra a variação de expressão observada entre estes subtipos para os genes *CDH1* e *VIM*, respectivamente.

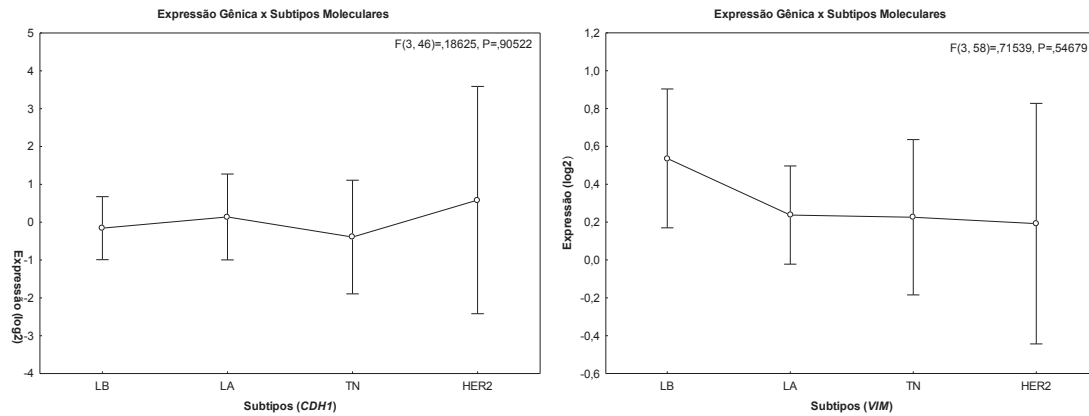


FIGURA 8: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EXPRESSÃO DOS GENES NOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA. (A) Valores de expressão do gene *CDH1* (B) Valores de expressão do gene *VIM*.

Legenda: Luminal A (LA); Luminal B (LB); HER2 positivo (HER2), triplo negativo (TN).

Considerando que a presença de metástases em linfonodos axilares é um importante parâmetro prognóstico que indica maior agressividade do tumor, avaliamos 28 amostras de linfonodos portadores de células metastáticas. Verificamos um aumento da expressão do gene *VIM* com a concomitante diminuição da expressão do gene *CDH1* nestas amostras (Figura 9). A expressão média foi de 0,30 para *CDH1* nos linfonodos axilares (9,5 vezes menor do que no sítio primário) e para *VIM* 1,74 (2 vezes maior do que no sítio primário) sendo a diferença entre os mesmos estatisticamente significativa.

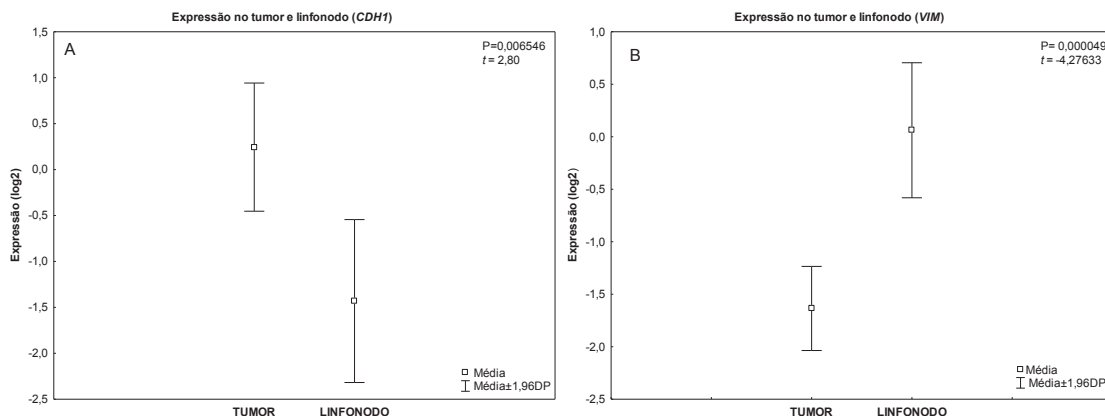


Figura 9 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TUMOR PRIMÁRIO E NO TECIDO METASTÁTICO. (A) Gene *CDH1* (B) Gene *VIM*.

A Figura 10 representa uma progressão tumoral comparando a expressão de ambos os genes no tecido não tumoral, em tumores com informações de linfonodos livres de metástase (negativos) e com metástases (positivos) e no

próprio linfonodo metastático. Em ambos os genes alvos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, com a progressiva diminuição da expressão do gene *CDH1* e aumento da expressão do gene *VIM*.

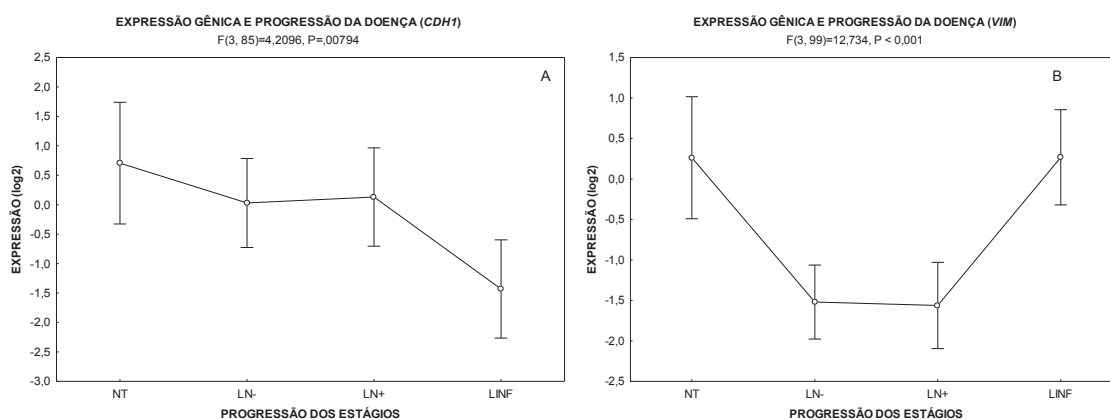


Figura 10 – ANÁLISE COMPARATIVA DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DA DOENÇA (A) Gene *CDH1* (B) Gene *VIM*.

Legenda: LN-, ausência de metástase nos linfonodos axilares; LN+, presença de metástase nos linfonodos axilares; NT, amostras não tumorais, LINF, amostras de linfonodos axilares.

6.2 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS.

A variação do número de cópias de DNA foi analisada em 113 amostras de carcinomas mamários para o gene *CDH1* e 109 para o gene *VIM*. A tabela 3 apresenta os dados de número de cópias e a análise de qui-quadrado para verificar se os números de perda (número de cópias inferior a 1,5), normal (entre 1,5 e 2,5) e ganho (valores acima de 2,5 cópias) ocorreram de acordo com o esperado. Verificamos que para ambos os genes, os valores observados são significativamente diferentes dos esperados considerando a ocorrência ao acaso dos mesmos (*CDH1* - $\chi^2 = 7,85$; $P < 0,05$; *VIM* - $\chi^2 = 42,28$; $P < 0,001$).

A idade média das pacientes analisadas foi de $55,6 \pm 15,2$. A variação do número de cópias nos genes *CDH1* e *VIM*, obtidos com o auxílio do *software* CopyCaller (Life Technologies™) está demonstrada no Anexo IV. Os testes referentes à análise de variação do número de cópias em relação aos dados histopatológicos e idade não demonstraram nenhum valor significativos para separação dos grupos. Os dados estão explicitados em gráficos no Anexo V. Os

percentuais das variações de número de cópias entre os grupos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 3 – Análise da distribuição do número de cópias para os genes *CDH1* e *VIM*

	<i>CDH1</i>	<i>VIM</i>
	N (%)	N (%)
Perda	38 (34)	22 (21)
Normal	48 (44)	68 (63)
Ganho	24 (22)	17 (16)
Total	110	107
	$\chi^2 = 7,85; P < 0,05$	$\chi^2 = 42,28; P < 0,001$

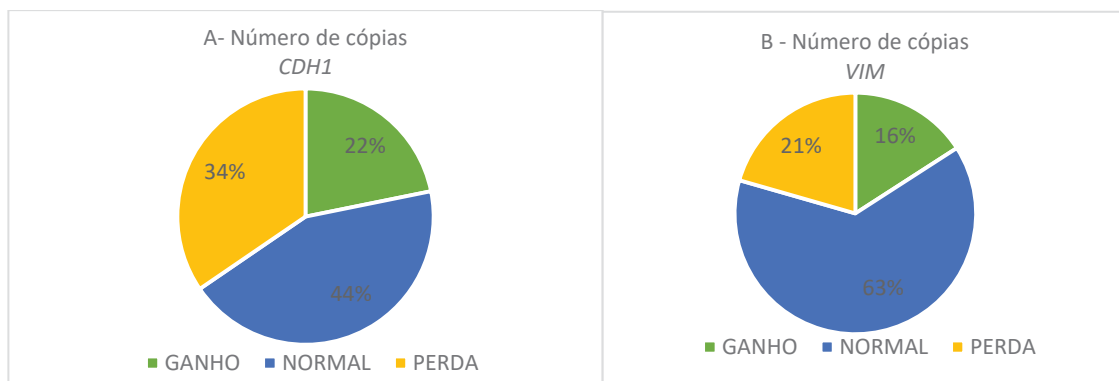


FIGURA 11: NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CDH1* (A) E *VIM* (B).

Tabela 4 - Percentuais das alterações do número de cópias encontrados nos genes *CDH1* e *VIM*.

GRUPOS	<i>CDH1</i>				<i>VIM</i>			
	GANHO	NORMAL	PERDA	N	GANHO	NORMAL	PERDA	N
LN-	37,10%	37,10%	25,80%	62	8,7%	69,5%	21,8%	46
LN+	18,86%	50,94%	30,20%	53	19,04%	60,3%	20,66%	63
GRAU I e II	18,7%	48%	33,3%	75	14,84%	62,16%	23%	74
GRAU III	33,3%	43,3%	23,4%	30	26,7%	56,6%	16,7%	30
RE+	17%	44,8%	38,2%	76	15,5%	64,7%	19,8%	71
RE-	27,27%	45,46%	27,27%	22	23,8%	42,85%	33,4%	21
RP+	17,14%	45,71%	37,15%	70	17,4%	66,7%	15,9%	63
RE-	18,2%	45,45%	36,35%	22	17,4%	43,4%	39,2%	23
HER2+	21,6%	56,8%	21,6%	37	24,32%	56,75%	18,93%	37
HER2-	9%	21%	23%	53	10,86%	65,2%	24%	46
Abaixo de 50 anos	27%	44%	29%	41	21,9%	56,2%	21,9%	41
50 anos ou mais	22,05%	45,6%	32,35%	68	16,2%	63,23%	20,57%	68

Legenda: LN-, ausência de metástase nos linfonodos axilares; LN+, presença de metástase nos linfonodos axilares; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; N, número amostral.

Para o gene *CDH1*, 24 amostras apresentaram ganho de número de cópias, 48 permaneceram com número de cópias normal e 38 apresentaram perda de cópias (FIGURA 11-A). Para o gene *VIM*, 17 amostras apresentaram ganho no número de cópias, 68 pacientes apresentaram número de cópias normal e 22 amostras apresentaram perda no número de cópias (FIGURA 11-B). Ambos os genes apresentaram instabilidade quanto ao número de cópias, onde temos valores de 56% e 36% para os genes *CDH1* e *VIM*, respectivamente. Da mesma maneira que foi realizado para a avaliação da expressão gênica, os parâmetros de idade e histopatológicos também foram testados, porém sem resultados estatisticamente significativos.

Quando comparada a variação do número de cópias entre os genes *CDH1* e *VIM* houve diferença significativa entre os mesmos, sendo que o primeiro

apresenta valor maior do número de cópias ($2,17 \pm 0,88$), já o segundo apresentou um valor médio inferior ($1,94 \pm 0,69$) (FIGURA 12).

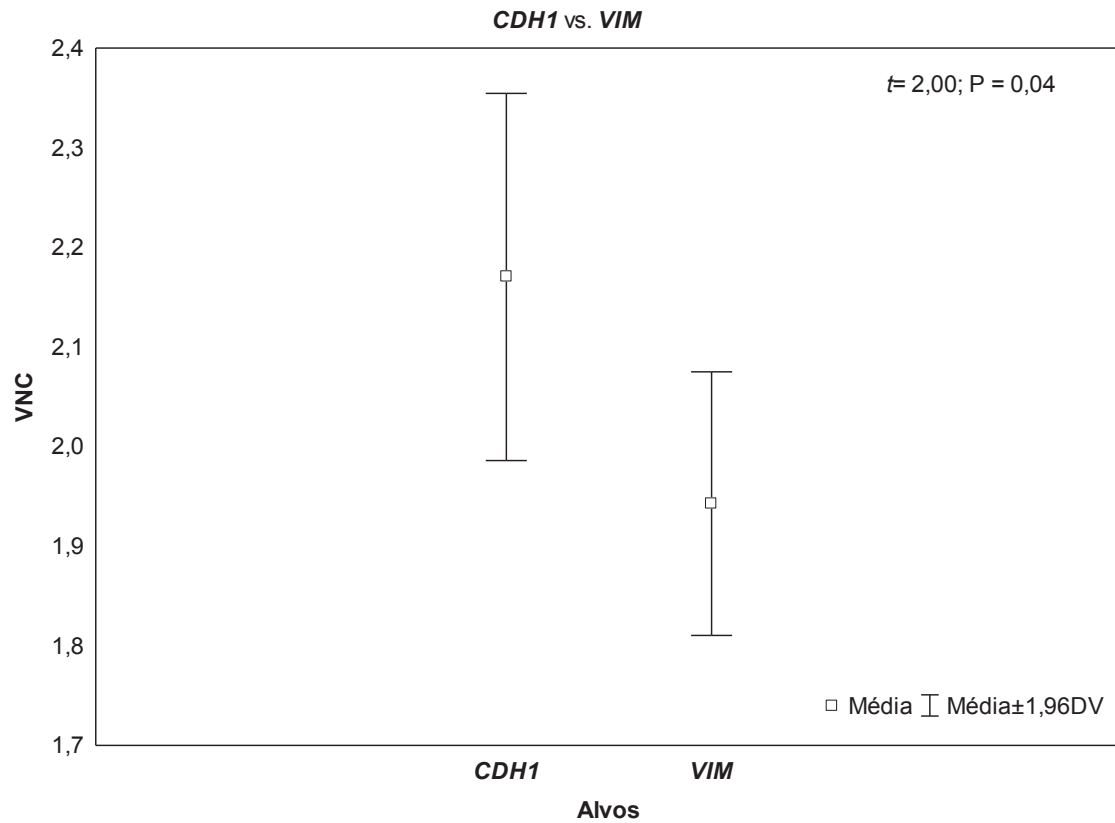


FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS ENTRE OS GENES DE ESTUDO.

Legenda: VNC, variação do número de cópias

6.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO

Foram analisadas 23 amostras de tumor para o gene *CDH1* e 20 amostras para o gene *VIM*. As amostras avaliadas para *VIM* mostraram, quase em sua totalidade, percentuais de metilação inferior a 0,01%. Para o gene *CDH1*, os resultados mostraram percentuais de metilação mais altos daqueles observados em *VIM*, porém ainda baixos ($6,50\% \pm 8,32$). Na figura 13, é possível observar que há uma diferença significativa entre o percentual de metilação dos dois genes alvos.

A tabela 5 abaixo apresenta os valores encontrados para cada amostra e gene avaliado.

Tabela 5 – Percentual (%) de metilação por gene alvo.

Amostra	% de Metilação em <i>CDH1</i>	% de Metilação em <i>VIM</i>
1	1.05	< 0.01
2	4.18	< 0.01
3	2.65	< 0.01
4	0.65	< 0.01
5	2.52	< 0.01
6	7.56	< 0.01
7	0.37	< 0.01
8	< 0.01	0.01
9	0.09	0.02
10	0.30	< 0.01
11	2.98	< 0.01
12	2.28	< 0.01
13	0.89	< 0.01
14	17.34	< 0.01
15	16.50	< 0.01
16	1.63	< 0.01
17	9.83	< 0.01
18	1.62	< 0.01
19	31.68	< 0.01
20	22.15	< 0.01
21	16.50	-
22	3.36	-
23	3.56	-

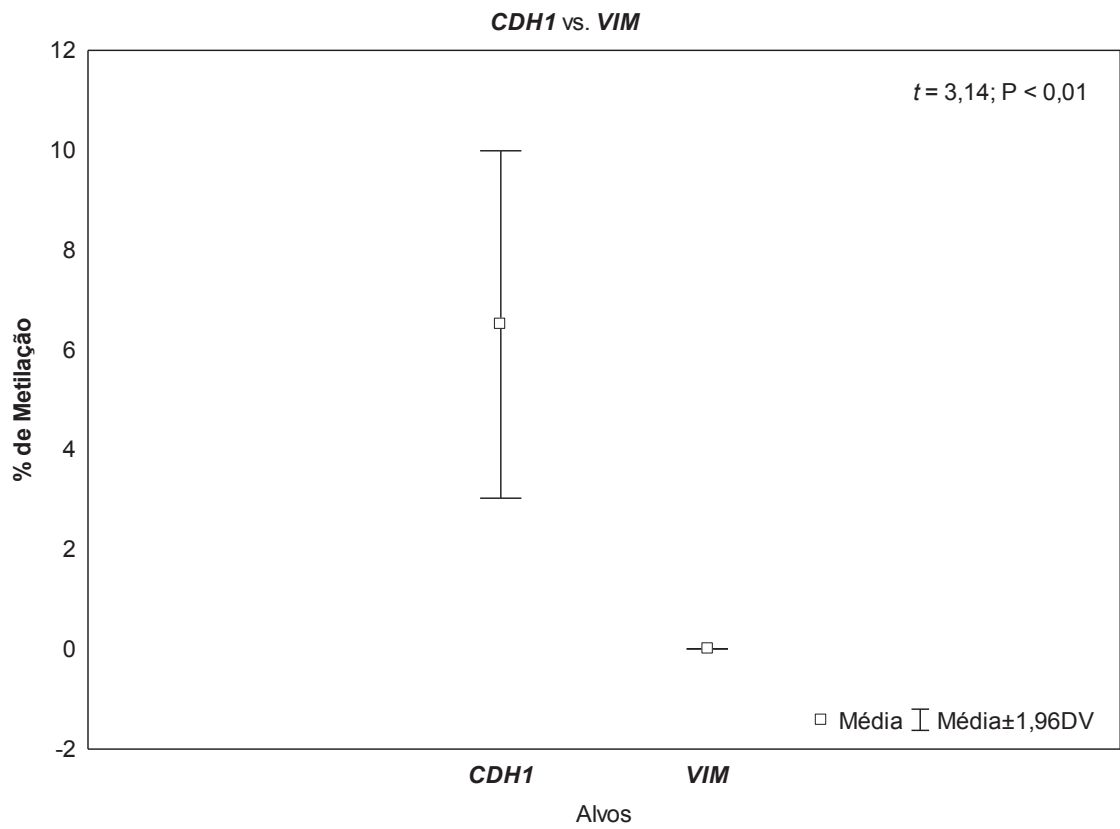


FIGURA 13. DISTRIBUIÇÃO DO PERCENTUAL DE METILAÇÃO ENTRE OS GENES *CDH1* E *VIM*.

6.4 ANÁLISE COMPARATIVA

A tabela 6 apresenta os valores obtidos nas amostras em que foi possível a avaliação pelos três métodos utilizados na avaliação dos genes *CDH1* (N=23) e *VIM* (N=20).

Tabela 6– Valores obtidos pelos três métodos utilizados.

Amostra	FC <i>CDH1</i>	VNC <i>CDH1</i>	% de Metilação em <i>CDH1</i>	FC <i>VIM</i>	VNC <i>VIM</i>	% de Metilação em <i>VIM</i>
1	89.40	Ganho	1.05	0.17	Perda	< 0.01
2	0.41	Perda	4.18	0.51	Normal	< 0.01
3	0.08	Normal	2.65	0.18	Perda	< 0.01
4	2.87	Normal	0.65	0.18	Normal	< 0.01
5	0.06	Perda	2.52	0.58	Normal	< 0.01
6	2.87	Ganho	7.56	0.15	Normal	< 0.01
7	21.04	Ganho	0.37	0.14	Normal	< 0.01
8	3.30	Perda	< 0.01	0.15	Normal	0.01
9	17.90	Perda	0.09	0.14	Normal	0.02
10	59.34	Normal	0.30	9.50	Perda	< 0.01
11	0.06	Normal	2.98	1.11	Normal	< 0.01
12	0.53	Perda	2.28	0.58	Normal	< 0.01
13	0.10	Normal	0.89	0.41	Normal	< 0.01
14	0.82	Normal	17.34	0.59	Normal	< 0.01
15	0.53	Perda	16.50	0.30	Normal	< 0.01
16	0.42	Perda	1.63	0.42	Normal	< 0.01
17	0.51	Ganho	9.83	4.80	Normal	< 0.01
18	2.87	Ganho	1.62	2.31	Ganho	< 0.01
19	0.39	Ganho	31.68	0.35	Perda	< 0.01
20	0.49	Ganho	22.15	12.67	Perda	< 0.01
21	0.52	Perda	16.50			-
22	4.65	Perda	3.36			-
23	23.01	Ganho	3.56			-

Legenda: FC: *fold change*; VNC; variação no número de cópias.

A figura 14 apresenta a distribuição da expressão gênica em relação à variação do número de cópias em ambos os genes. Não foram encontrados, através da análise de regressão linear, valores significativos para *CDH1* (P= 0,67) e *VIM* (P=0,60).

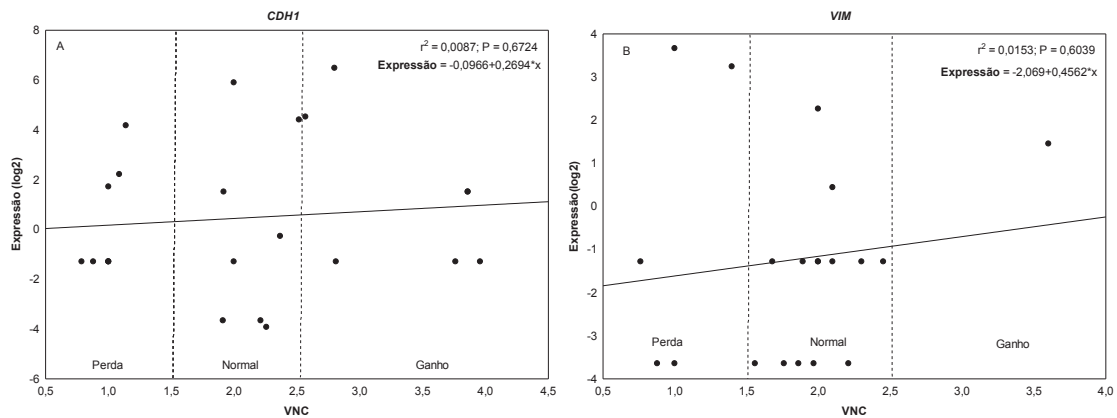


Figura 14. REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO AMOSTRAL EXPRESSÃO GÊNICA X VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS. (A) *CDH1* (B) *VIM*.

Legenda: VNC, variação do número de cópias.

A figura 15 representa a distribuição da expressão gênica em função do percentual de metilação, e a análise de regressão linear mostrou que há relevância estatística ($P=0,04$). O aumento do percentual de metilação está inversamente relacionado ao nível de expressão gênica.

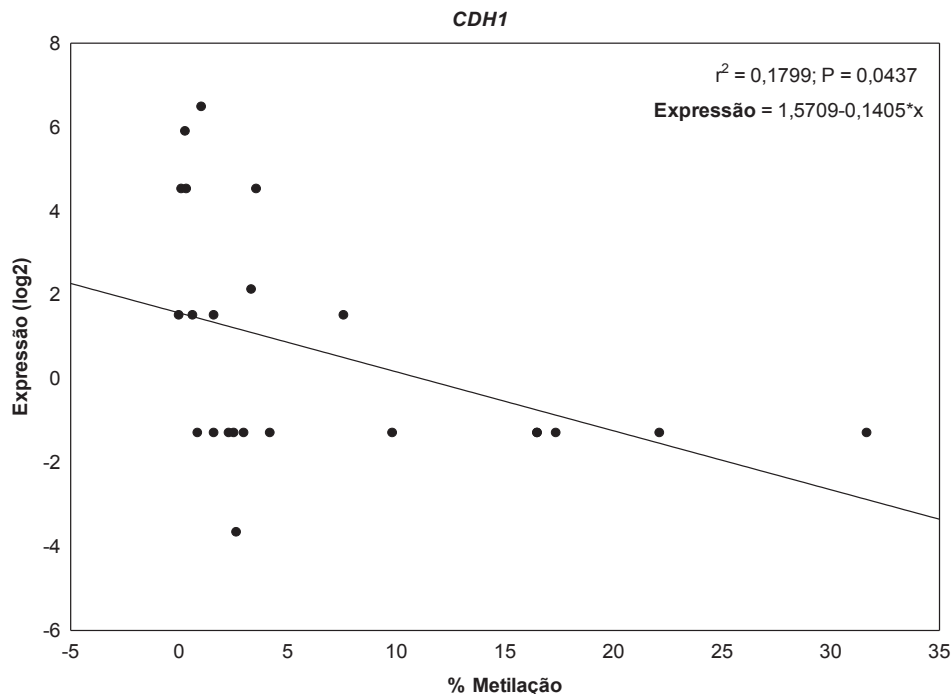


Figura 15. REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO AMOSTRAL EXPRESSÃO GÊNICA X PERCENTUAL DE METILAÇÃO PARA O GENE *CDH1*.

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia que mais acomete mulheres em todo o mundo, e a maior causa de óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2017) principalmente devido ao diagnóstico tardio que possibilita o desenvolvimento de metástases. Portanto, sabe-se que o diagnóstico precoce é de fundamental importância para reduzir a mortalidade por câncer de mama, tornando essencial o estudo desta doença. Através da integração entre métodos de análises moleculares e dados histopatológicos é possível auxiliar na identificação e classificação do câncer de mama, bem como compreender a evolução do processo, procurando auxiliar também na predição do prognóstico. Sendo assim, neste trabalho procuramos integrar os dados obtidos por diversos métodos de análise para melhor compreender o processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM). A TEM é um processo pelo qual células tumorais passam por uma conversão fenotípica adquirindo mobilidade e facilitando sua disseminação para sítios distantes do tumor primário (tecido ou órgãos), caracterizando o processo de metástase e sendo desencadeado por alterações que podem reprimir ou ativar genes por mecanismos genéticos e/ou epigenéticos (THIERY *et al.*, 2009). Os genes *CDH1* e *VIM*, que foram alvos do presente estudo, estão diretamente relacionados com este processo. Conforme já explicitado na revisão bibliográfica, há uma diminuição da expressão de *CDH1* na TEM, com concomitante aumento da expressão de *VIM*. Neste trabalho, tivemos o objetivo de avaliar o comportamento destes genes quanto à sua variação de expressão bem como os fatores que podem estar associados a essa variação, como o número de cópias e a metilação de suas regiões promotoras. Na análise dos dados, o foco principal foi dado às células tumorais, a fim de caracterizar as variações dentro da própria doença (considerando a classificação e dados clínicos-histopatológicos), desde que a TEM ocorre como uma etapa na progressão do tumor, não sendo esperada nas células mamárias diferenciadas normais uma vez que é considerada um processo normal somente na fase embrionária. Desta forma, analisamos um grupo de amostras de tecido mamário normal como parâmetro de “normalidade” em algumas comparações, porém as análises estatísticas se concentraram nas amostras de carcinomas.

O estudo da expressão gênica vem sendo utilizado para avaliar genes que possam estar relacionados ao início e progressão de todos os tipos de câncer, e assim fornecer melhores previsões de resultados clínicos do que as técnicas tradicionais. A identificação de novos marcadores moleculares avaliando sítios primários de carcinomas mamários é objeto de diversos estudos e apresentam grande potencial preditivo ao surgimento de metástases tanto nos linfonodos axilares quanto em sítios sistêmicos (KUROSUMI e TAKEI, 2007; SHRIVER *et al.*, 2014; CANEVARI *et al.*, 2016). 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 podem resultar em alterações na expressão gênica (JONES e BAYLIN, 2007).

As alterações de número de cópias são comuns no câncer, podendo determinar alterações da expressão de genes localizados na região alterada do genoma. Essas alterações podem afetar a expressão tanto de oncogenes como de genes supressores de tumor, influenciando na progressão da doença assim como podem estar diretamente relacionadas a um pior prognóstico (KALLIONIEMI, 2008). Apesar de nem sempre se ter concordância entre a presença de variantes estruturais em locais específicos do genoma (como a variação no número de cópias) e a alteração na expressão dos genes, a variação na sua dosagem pode levar à instabilidade genômica (FEUK *et al.*, 2006).

Ao analisarmos a expressão destes dois genes alvos nas amostras de tumor primário, verificamos uma expressão aumentada do gene *CDH1* (vide FIGURA 1), quando comparada à expressão do gene *VIM*, fato normalmente associado ao estágio epitelial das células, que se encontram fixas à membrana basal e com relativa perda de mobilidade. A expressão aumentada é muito importante para manter a forma e polaridade celular, de forma que o produto do gene *CDH1* acaba por regular negativamente o processo metastático atuando como um supressor de tumor (YILMAZ e CHRISTOFORI, 2010). Diante deste resultado, interpretamos que, de acordo com a expressão média deste gene, a maioria das amostras não se encontrava em estágio de TEM, permanecendo com o fenótipo epitelial. Considerando que o gene *CDH1* é fortemente expresso

nos ductos (células epiteliais) das glândulas mamárias normais, mas não no estroma, a presença de ductos normais (remanescentes do processo de macrodissecção) pode ter contribuído para que a expressão de *CDH1* apresenta-se em níveis mais elevados na amostra como um todo, além da própria heterogeneidade tumoral e das características intrínsecas das amostras utilizadas. Devemos também considerar que a perda de expressão de *CDH1* é um evento transitório e seletivo para a desdiferenciação celular e invasão em carcinomas, pois ocorre durante a mobilização das células, sendo que após a sua fixação no sítio secundário sua expressão tende a aumentar, ocorrendo o oposto ao gene *VIM*, como citado anteriormente (KOWALSKI *et al.*, 2003). Outra situação em que se vê uma característica redução da expressão de *CDH1* é no diagnóstico de carcinomas lobulares (ACS *et al.*, 2001), não incluídos na nossa amostra, em que foram selecionados somente carcinomas ductais.

Diversos estudos demonstraram uma relação entre dados histopatológicos e idade com a variação da expressão de *CDH1*, e principalmente aos fatores ditos de prognóstico ruim como receptores de estrógeno e progesterona negativos, grau do tumor, idade avançada etc. (OKA *et al.*, 1993; SIITONE *et al.*, 1996; HUNT *et al.*, 1997). Estes dados não foram corroborados por outros autores, tais como Lipponen *et al.* (1994) e Acs *et al.* (2001). Nossos dados se assemelham aos destes últimos autores desde que não houve diferença estatisticamente significativa entre as devidas comparações, conforme demonstrado nas figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7. O trabalho realizado por Tiezzi *et al.* (2007) demonstrou que a indução de células ductais ao processo carcinogênico apresentava uma gradativa e progressiva inversão nas expressões de E-caderina e vimentina. Desta forma, a ausência de significância estatística pode ser decorrente do próprio processo gradativo da transição e pela maioria das amostras estarem em estágio epitelial, conforme discutido acima.

Corroborando a hipótese de estágio epitelial, seja por características intrínsecas seja por contaminação com células normais, a expressão média do gene *VIM* encontrava-se diminuída na nossa amostra. No processo de TEM espera-se uma expressão relativamente aumentada do gene *VIM* (quando comparada à expressão do gene *CDH1*) que é associada ao estágio

mesenquimal, quando as células se desprendem da membrana basal, sofrem alterações nas suas características ganhando mobilidade dentre outras características (KORSCHING *et al.*, 2005; MANI *et al.*, 2008). O aumento da expressão do gene *VIM* influencia a migração celular e, à medida que a célula se fixa num sítio secundário, sua expressão tende a diminuir. Assim, a vimentina (proteína codificada por *VIM*) tem uma contribuição funcional para a migração, podendo então ser utilizada como um marcador do fenótipo mesenquimal para o câncer de mama. A expressão aumentada de *VIM* já foi detectada em linhagens de câncer de mama consideradas mais agressivas (MDA-231 e 435S, Hs578T), e também associada ao grau histológico III (KOKKINOS *et al.*, 2007). A figura 2B demonstra a distribuição da expressão gênica entre pacientes separados pela idade, e o resultado demonstrou diferença estatisticamente significativa ($t= 2,26$; $P= 0,02$). Os pacientes com idade igual ou inferior a 50 anos apresentaram expressão gênica 1,8 vezes maior do que pacientes com idade superior a 50 anos. A idade é um fator de risco para o surgimento de cânceres, esperando uma correlação positiva entre surgimento do câncer e aumento da idade. Por outro lado, tumores em mulheres mais jovens, abaixo dos 50 anos, tendem a ser mais agressivos, com maior número de recidivas e metástases à distância e a expressão aumentada de *VIM* nestas pacientes pode estar relacionada à maior agressividade da doença.

Na figura 8 observa-se a distribuição da expressão gênica entre os subgrupos moleculares, classificados de acordo com a imunistoquímica. Nenhum dos genes demonstra significância estatística na análise de variância, demonstrando que a expressão de *CDH1* e *VIM* não são bons parâmetros para discriminar os subgrupos. O padrão de distribuição da expressão gênica entre os subgrupos analisados não é o mesmo entre os genes *CDH1* e *VIM*, por exemplo, pacientes classificadas como do grupo HER2 apresentam maior expressão de *CDH1*, já para *VIM* o grupo Luminal B apresenta valor de expressão maior dentre os subgrupos moleculares. A literatura não demonstra muitos estudos em relação à expressão desses genes e classificação molecular/imunistoquímica. No trabalho de Rapatoni (2013), não foi encontrada expressão gênica de *VIM* nos subtipos Luminal A e HER2, e baixa expressão em Luminal B, porém nos tumores TN foi encontrada alta expressão desse gene.

No mesmo estudo a expressão de *CDH1* não foi observada em Luminal B e HER2. Os subtipos Luminal A e TN apresentaram 7,1% e 61,9% dos casos com expressão reduzida.

De forma geral, pacientes que apresentam metástases em linfonodos são considerados como tendo um pior prognóstico e com risco aumentado para metástase em sítios distantes (MOEBUS *et al.*, 2010). No câncer de mama, os linfonodos axilares são um importante sítio para avaliação de metástases e considerados parâmetro para estadiamento e prognóstico (CHENG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011). Em função disso se faz importante a avaliação comparativa do sítio primário da doença e amostras de linfonodos axilares. Procedemos à análise de expressão em tecido metastático, representado por 28 amostras de linfonodos. Nestes, a expressão de *CDH1* apresentava-se diminuída em relação à de *VIM* de forma significativa correspondendo ao esperado para células em TEM e com maior mobilidade. A figura 9 também corrobora com o esperado quando mostra uma diferença estatisticamente significativa entre o sítio primário da doença e o linfonodo, para ambos os genes. O trabalho de LU *et al.* (2003) demonstra que o aumento da expressão de *VIM* estimulado pelo receptor EGF, leva à ativação da via RAS-MAPK, ativando fatores que reprimem a transcrição de *CDH1*. Essa característica faz com que as células ganhem marcadores mesenquimais que são vistos na TEM (GARG, 2013).

A figura 10 mostra o que seria esperado de uma progressão da doença, e podemos verificar que a expressão do gene *CDH1* diminui progressivamente, com menor nível de expressão no linfonodo metastático, enquanto o gene *VIM* apresenta um significativo aumento de expressão no linfonodo em relação às amostras tumorais. Estes fatos corroboram com o esperado visto que a diminuição da expressão de *CDH1* é favorável à mudança para o estado mesenquimal, e com isso leva aos ganhos morfofisiológicos necessários à célula para a caracterização do processo metastático e progressão da doença. O produto proteico de *VIM* atua crucialmente na manutenção do citoesqueleto, organização dos microtúbulos bem como motilidade celular, o que está associado à agressividade do tumor (RAYMOND e LEONG 1989), maior malignidade e menor taxa de sobrevida em pacientes com câncer de mama (LIU *et al.*, 2015). A alteração na expressão desses genes pode ocorrer devido a

diversos fatores que incluem a variação no número de cópias e eventos epigenéticos por nós estudados.

A avaliação do número de cópias de *CDH1* nos tumores indicou que a maioria (56%) das amostras apresentou ganho ou perda do número de cópias do gene, enquanto 44% das amostras apresentaram número de cópias normal. Observa-se que há uma predominância na redução do número de cópias de *CDH1* (34%). Isto já foi descrito no estudo de Sun e colaboradores (2012), que indicou perda no número de cópias de *CDH1* em 22,8% das amostras de carcinomas ductais mamários, sendo que a maioria que apresentava essa alteração estava relacionada com piores prognósticos, como cânceres do tipo triplo negativos e com positividade para o receptor HER2. No nosso estudo, o maior percentual de perda de *CDH1* foi observado nos grupos LN+ e pacientes com idade igual ou superior a 50 anos. No estudo de Sun e colaboradores (2012), os autores ainda identificaram variação no número de cópias de outros genes como *CDH3*, *CTCF* e *E2F4* que se localizam na mesma região que o *CDH1* (16q22.1), apoiando a hipótese de que a variação do número de cópias da região 16q22.1 é um evento frequente no câncer de mama, podendo contribuir com a iniciação e progressão do câncer. O número de cópias e a expressão gênica em alguns casos não se encontram relacionados, ou seja, não se observa que o aumento da expressão seja devido ao aumento do número de cópias ou o inverso, como no estudo de Callegari *et al.* (2016) onde não se observou a dependência entre o número de cópias alterado com a expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* em carcinomas primários de mama.

Em revisão realizada por Tang e Amon (2013) foi demonstrado que vários estudos encontraram associação entre aumento do número de cópias e da expressão gênica e proteica. Porém, outros mecanismos são descritos nesta regulação gênica podendo não haver esta associação (JONES *et al.*, 2008), tanto em nível transcricional (BRANHAN *et al.*, 2012) como traducional (BELGUISE *et al.*, 2005). O estudo de Platzer *et al.* (2002) em epitélio normal de cólon, demonstra que em apenas 3,8% dos genes que se encontravam em regiões com ganhos de cópias era observada correlação positiva com a expressão gênica. No nosso estudo verificamos predominância da diminuição do número de cópias, em relação ao ganho, e aumento da expressão de *CDH1*,

porém se analisarmos as amostras individualmente encontramos associações correspondentes ao esperado. As amostras 2, 5, 12, 15, 16 e 21 (Tabela 5) apresentam níveis de expressão reduzidos e perda do número de cópias de *CDH1*. Já as amostras 1, 7 e 23 da mesma tabela, apresentam valores altos de expressão gênica concomitantes com o ganho do número de cópias deste gene.

O estudo da variação do número de cópias do gene *VIM* demonstrou que a maioria das amostras permaneceu com o número inalterado. Porém, um dado importante é que aproximadamente 37% das amostras apresentaram variação no número de cópias (21% de perda e 16% de ganho). Isso indica uma instabilidade genética que pode influenciar na expressão desse gene. No nosso estudo, a variação do número de cópias do gene *VIM* analisada nos diferentes subgrupos clinico-histopatológicos, não foi suficiente para discriminar os mesmos.

A figura 12 apresenta a distribuição da variação do número de cópias de forma comparativa entre os genes alvos. O gene *CDH1* apresentou maior número de cópias de forma significativa ($t = 2,00$, $P=0,04$) em relação a *VIM*. Não há consenso na literatura frente ao ganho e perda do número de cópias do gene *CDH1* no câncer de mama. Moelans *et al.* (2010), encontraram 10% de ganhos (amplificações e altos níveis de amplificação) e 20% de perda desse gene. A perda do número de cópias de *CDH1* é normalmente relacionada a estágios pré-invasivos de carcinomas lobulares *in situ* (MARIE E JANSEN, 2002). Sun *et al.* (2012) observaram em 101 amostras de carcinoma ductal mamário, 22,8% de perda de *CDH1* e somente 4% de ganho. A associação de perda de cópias desse gene com prognóstico negativo, foi observada por Sun e colaboradores (2012) assim como no nosso estudo, onde amostras com presença de metástase nos linfonodos axilares apresentaram percentual de perda igual a 30,20% (Tabela 3). Em relação ao gene *VIM*, Horlings e colaboradores (2010) avaliando alterações do número de cópias em pacientes com câncer de mama, encontraram ganhos na região 10p13 onde se localiza o gene. Esses dados foram associados com fatores de prognóstico ruim, e no nosso estudo observamos 19,04% de ganho para o grupo que apresentava metástase nos linfonodos axilares (Tabela 3).

A metilação da região promotora é associada à redução da expressão e/ou silenciamento dos genes interrompendo o processo transcricional, atuando assim de forma regulatória na expressão gênica (ESTELLER, 2007). Estudos têm demonstrado que há relação entre padrões de metilação em regiões promotoras de genes envolvidos com processos carcinogênicos (ESTELLER, 2008; KULIS e ESTELLER, 2010). O estudo de Oliveira *et al.* (2009) demonstrou que a hipermetilação de *CDH1* leva à inativação da expressão em pacientes com câncer gástrico hereditário e o uso de drogas que revertem os padrões de metilação podem ser utilizados como terapia.

Na análise de metilação da região promotora dos genes alvos em amostras de sítio primário, é possível observar que o percentual de metilação é maior no gene *CDH1* do que em *VIM*, estando de acordo com o esperado. Ainda que os valores de metilação não sejam altos o suficiente para indicar um silenciamento no gene *CDH1* (cerca de 10%) é importante ressaltar que em um processo gradativo o padrão de metilação deveria aumentar conforme a evolução da doença. Seria de se esperar que em amostras de linfonodos metastáticos o padrão de metilação do gene *CDH1* fosse mais alto, contudo devido a limitações técnicas essa análise não pode ser realizada no presente estudo.

A tabela 5 apresenta os dados de percentuais de metilação entre os genes *CDH1* e *VIM*, onde é possível observar que quase 100% das amostras pareadas apresentam-se hipometiladas em *VIM* e que o percentual de metilação aumenta nas amostras testadas para o gene *CDH1*. A figura 13 ilustra a distribuição dos percentuais de metilação sendo significativamente maior em *CDH1* ($t = 3,14$, $P < 0,01$). A tabela 6 apresenta os dados associados de expressão gênica, variação do número de cópias e percentuais de metilação. É possível notar que alguns casos (amostras 14, 15, 17, 19, 20 e 21) correspondem ao esperado apresentando diminuição da expressão e percentuais altos de metilação para *CDH1*. Já para o gene *VIM*, como a totalidade das amostras apresentaram-se hipometiladas, não se pode fazer esta análise. A figura 14 representa a análise de regressão linear entre variação do número de cópias e expressão gênica. Em ambos os genes, *CDH1* e *VIM*, não foi encontrado correspondência significativa estatística ($P = 0,67$ e $P = 0,60$, respectivamente). Já a figura 15, que mostra a

regressão linear entre expressão e percentual de metilação, demonstrou que o percentual de metilação é significativamente correspondente ($P= 0,04$) com a variação do número de cópias para o gene *CDH1*. Os dados dos padrões de metilação estão de acordo com o esperado, visto que como já dito anteriormente, é esperado que ocorra um silenciamento ou redução da expressão gênica de *CDH1* e isso ocorra de forma gradativa, assim como a hipometilação do promotor de *VIM*. A mesma análise foi realizada para o gene *VIM*, porém como não há variação do percentual de metilação era esperado que não houvesse correspondência significativa.

É importante salientar que o estudo explorou dois dos mecanismos que podem influenciar a expressão gênica (variação do número de cópias e metilação). Analisando os dados em conjunto, verifica-se que a expressão do gene *CDH1* parece ser regulada por ambos os mecanismos, enquanto a regulação da expressão do gene *VIM* não parece sofrer forte influência dos mesmos. É bem definido que o microambiente do tumor é extremamente heterogêneo e que inúmeros outros fatores podem estar relacionados ao controle da expressão desses genes. Entre os mecanismos de regulação pós-transcricionais, destacam-se os RNAs não codificadores, como os microRNAs e os lncRNAs, revisados em Ramos *et al.* (2017) – Capítulo 1 deste trabalho.

8. CONCLUSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o padrão de expressão dos genes *CDH1* e *VIM* em amostras de pacientes com carcinomas mamários, e os possíveis mecanismos que regulam as alterações de expressão que ocorrem na TEM. Observamos que à medida que a doença progride, verifica-se a inversão do padrão de expressão, como era esperado pelas descrições da literatura. De acordo com os nossos dados, concluímos que para o gene *CDH1* parece haver envolvimento tanto da variação do número de cópias como do padrão de metilação de sua região promotora. Já para o gene *VIM*, sugerimos que outros mecanismos (como por exemplo, os miRNAs) possam ter maior influência, pois observamos pouca variação no número de cópias e baixo nível de metilação das regiões promotoras. Em relação às análises dos parâmetros utilizados em pacientes com câncer de mama para classificação e prognóstico, concluímos que a expressão e a variação do número de cópias destes genes não são bons marcadores para estratificação em subgrupos, porém o padrão de expressão é um forte indicador de progressão da doença.

REFERÊNCIAS

ACKLAND, M.L.; NEWGREEN, D.F.; FRIDMAN, M.; WALTHAM, M.C.; ARVANITIS, A.; MINICHELLO, J.; PRICE, J.T.; THOMPSON, E.W. Epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. **Laboratory Investigation**, 83: 435–448, 2003.

ACS, G.; LAWTON, T.J.; REBBECK, T.R.; LIVOLSI, V.; ZHANG, P.J. Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast cancer and its biologic and diagnostic implications. **American Journal of Clinical Pathology**, 115: 85-98, 2001.

AHN, J.; SCHATZKIN, A.; LACEY, J.R.; JY, 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.

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

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.

ANJUM, S.; FOURKALA, E-O.; ZIKAN, M.; WONG, A.; GENTRY-MAHARAJ, A.; JONES, A. *et al.* A *BRCA-1* mutation associated DNA methylation signature in blood cells predicts sporadic breast cancer incidence and survival. **Genome Medicine**, 6: 47, 2014.

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.

ÁSGEIRSSON, K.S.; JÓNASSON, J.G.; TRYGGVADÓTTIR, L.; ÓLAFDÓTTIR, K.; SIGURGEIRSDÓTTIR, J.R.; INGVARSSON, S.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H.M. Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. **Europe Journal Cancer**, 36:1098-1106, 2000.

BADER, A.A.; TIO, J.; PETRU, E.; BUHNER, M.; PFANHLBERG, A.; VOLKHOLZ, H.; TULUSAN, A.H. T1 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.

BELGUISE, K.; KERSUAL, N.; GALTIER, F.; CHALBOS, D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. **Oncogene**, 24: 1434-44, 2005.

BENUSIGLIO, P.R.; MALKA, D.; ROULEAU, E.; DE PAUW, A. *et al.* *CDH1* germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. **Journal of Medical Genetics**, 50:486-489, 2013.

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

BOUCHARD, L. *et al.* Prevention and genetic testing for breast cancer: variations in medical decisions. **Social Science & Medicine**, 58: 1085-1096, 2004.

BRABLETZ, T.; HLUBEK, F.; SPADERNA, S.; SCHMALHOFER, O.; HIENDELMAYER, E.; JUNG, A. *et al.* Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. **Cells Tissues Organs**, 179(1-2):56-65, 2005.

Branham MT, *et al.* Methylation profile of triple-negative breast carcinomas. **Oncogenesis**, 1:17, 2012.

CAI, Y.; YU, X.; HU, S.; YU, J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**; 7(4), 147–154, 2009.

CALDEIRA, J.R.F.; PRANDO, E.C.; QUEVEDO, F.C.; NETO, F.A.M.; RAINHO, C.A.; ROGARRO, S.R. *CDH1* promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. **BMC Cancer**, 6: 1-9, 2006.

CALLEGARI, C.C.F, *et al.* Copy number and expression analysis of *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* and *CCND1* genes in primary breast tumors with axillary lymph node metastasis. **Cancer Genetics**, 209: 331-339, 2016.

CANEVARI, R.A. *et al.* Identification of novel biomarkers associated with poor patient outcomes in invasive breast carcinoma. **Tumour Biology**, 37:13855-18870, 2016.

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.

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.

CHEN, Z. L. *et al.* microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin. **The Journal of Biological Chemistry**, 286, 10725–10734, 2011.

CHENG, G. *et al.* Current status of sentinel lymphnode biopsy in patients with breast cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, 38; 562-575, 2011.

CHENG, C. W. *et al.* Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. **Oncogene**, 20; 3814–3823, 2011.

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.

CONDEELIS, J.; SEGALL, J.E. Intravital imaging of cell movement in tumours. **Nature Reviews Cancer**, 3: 921–930, 2003.

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**; 17:2025-2028, 2008.

DEBIES, M.T.; WELCH, D. R. Genetic basis of human breast cancer metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. 2001.

DE CRAENE, B.; VAN ROY, F.; BERX, G. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. **Cell Signal**, 17:535–547, 2005.

DE CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature Reviews**, 13: 97- 107, 2013.

DESANTIS, C.; MA, J.; BRYAN, L.; JEMAL, A. Breast Cancer statistics, 2013. **A cancer Journal for Clinicians**, Jan-Feb;64(1):52-62. doi: 10.3322/caac.21203, 2014.

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

- DUTSCH-WICHEREK, M.; LAZAR, A.; TOMASZEWSKA, R. The potential role of MT and vimentin immunoreactivity in the remodeling of the microenvironment of parotid adenocarcinoma. **Cancer Microenvironment**, 4(1):105–113, 2010.
- 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.
- ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, 8:286-98, 2007.
- ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **The New England Journal of Medicine**, 358 :1148–1159, 2008.
- 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): 793-797, 1999.
- EVANS, R.M. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. **Bioessays**, 20: 79–86, 2004.
- 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.
- FEUK, L.; CARSON, A.R.; SCHERER, S.W. Structural variation in the human genome. **Nature Reviews Cancer**, 7:85-97, 2006.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, 453– 458, 2003.
- 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.
- GALL, T.M.H.; FRAMPTON, A.E. Gene of the month: E-cadherin (*CDH1*). **Journal of Clinical Pathology**, 66:928-932, 2014.
- GARG, M. Epithelial-mesenchymal transition – activating transcription factors – multifunctional regulators in cancer. **World Journal of the Stem Cells**, 5, 188-195, 2013.
- GIESER, L.; SWAROOP, A. Expressed sequence tags and chromosomal localization of cDNA clones from a subtracted retinal pigment epithelium library. **Genomics**, 13: 873-876, 1992.

GILLES, C.; POLETTE, M.; MESTDAGT, M.; NAWROCKI, B.; RABY, P.; RUGGERI, P.; BIREMBAUT, J.; FOIDART, M. Transactivation of vimentin by betacatenin in human breast cancer cells. **Cancer Research**, 63: 2658–2664, 2004.

GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**, 22: 1736-1747, 2011.

GOMES, M.V.; GOMES, C.C.; RAMOS, E.S. Methylation pattern at the KvDMR n a child with Beckwith-Wiedemann Syndrome conceived by ICSI. **American Journal of Medical Genetics**, 143: 625-629, 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): 4531-4535, 1995.

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.

GRADY, W.M.; WILLIS, J.; GUILFORD, P.J. *et al.* Methylation of the *CDH1* promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. **Nature**, 26, 16-17, 2000.

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

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

GUARINO, M.; RUBINO, B.; BALLABIO, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. **Pathology**, 39 (3):305–18, 2007.

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

GUPTA GP, MASSAGUÉ, J. 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.

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.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100: 57-70, 2000.

HANAHAN, D. AND WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5): 646-74, 2011.

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

HAY, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anatomic**, 154: 8–20, 1995.

HAY, E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Dev Dyn**, 233(3):706–20, 2005.

HAYATSU, H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutation Research**, 659, 77-82, 2008.

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: 4525-4530, 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): 6870-5, 1998.

HIRSHFIELD, K.M.; GANESAN, S. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and targeted therapy. **Current opinion in obstetrics and gynecology**. 26(1): 34-40, 2014.

HORLINGS, H.M. *et al.* Integration of DNA Copy Number Alterations and Prognostic Gene Expression Signatures in Breast Cancer Patients. **Clinical Cancer Research**, 16, 651-663, 2010.

HORNBERG, J.J. Cancer: a systems biology disease. **Biosystems**, 83: 81–90, 2006.

HU, L.; LAU, S.H.; TZANG, C.H. *et al.* Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. **Oncogene**, 23: 298–302, 2004.

HUNT, N.C.; JASANI, A.G.; MORGAN, J.M.; PIGNATELLI, M. Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastasis in small breast carcinomas. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, 430: 285-289, 1997.

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**, 7, 2002.

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde. Acesso em setembro de 2014. Disponível em: <http://www.inca.org.br>.

INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde. Acesso em agosto de 2017. Disponível em: <http://www.inca.org.br>.

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

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, 2011.

ISERI, O.D.; KARS, M.D.; ARPACI, F.; ATALAY, C.; PAK, I.; GUNDUZ, U. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. **Biomedicine Pharmacotherapic**, 65:40-5, 2011.

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): 683-92. 2007.

JONES, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. **Science**, 321:1801-1806, 2008.

KALLIONIEMI, A. CGH microarrays and cancer. **Current Opinion in Biotechnology**. 19(1):36-40, 2008.

KALLURI, R., AND NEILSON, E.G. Epithelialmesenchymal transition and its implications for fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**: 112:1776–1784, 2003.

KALLURI R.; WEINBERG R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, 119(6):1420–8, 2009.

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.

KIM, H.J.; LITZENBURGER, B.C.; CUI, X. *et al.* Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. **Molecular and Cellular Biology**, 27(8):3165–3175, 2007.

KIM, N. H. *et al.* A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. **Journal of the Cell Biology**, 195, 417–433, 2011.

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.

KOKKINOS, M.I.; WAFAI, R.; WONG, M.K.; NEWGREEN, D.F.; THOMPSON, E.W.; WALTHAM, M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer observations *in vitro* and *in vivo*. **Cells Tissues Organs**, 185(1-3):191-203, 2007.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 68, 820–823, 1971.

KONG, D. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. **Plos One**, 5, e12445, 2010.

KORSCHING, E.; PACKEISEN, J.; LIEDTKE, C.; HUNGERMANN, D.; WULFING, P.; VAN DIEST, P.J.; BRANDT, B.; BOECKER, W.; BUERGER, H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? **The Journal of Pathology**, 206: 451–457, 2005.

KOWALSKI, P.J.; RUBIN, M.A.; KLEER, C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. **Breast Cancer Research**, 5: 217-222, 2003.

KULIS M, ESTELLER M. DNA methylation and cancer. **Advances in Genetics**, 70:27-56, 2010.

KUROSUMI M., TAKEI H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. **Breast Cancer**, 14: 342-349, 2007.

KUSTIKOVA, O.; KRAMEROV, D.; GRIGORIAN, M.; BEREZIN, V.; BOCK, E.; LUKANIDIN, E.; TULCHINSKY, E. FRA-1 induces morphological transformation and increases *in vitro* invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. **Molecular and Cellular Biology**, 18:7095–7105, 1998.

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.

LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews Genetics**, 3, 253-266, 2003.

LARSSON, A.U.; WILHELMSSON, M.; PEKNA, M. Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(–/–)Vim(–/–) mice. **Neurochemical Research**, 29: 2069–2073, 2004.

LEE, J.S. *et al.* Factors influencing the outcome of breast cancer patients with 10 or more metastasizes axillary lymph nodes. **International Journal of Clinical Oncology**, 16: 473-481, 2011.

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

LIU, C.-Y. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, 6: 15966–83, 2015.

LIPPONEN, P.; SAARELAINEN, E.; AALTOMAA, H.; SYRJANEN, K. Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. **The Journal of Pathology**, 174: 101-109, 1994.

LOMBAERTS, M.; WEZEL, T.V.; PHILIPPO, K.; DIERSSEN, J.W.F.; ZIMMERMAN, R.M.E.; OOSTING, J.; EIJK, R.V.; EILERS, P.H.; WATER, CORNELISSE, C.J. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, 94: 661-671, 2006.

LU, Z.; GOSH, S.; WANG, Z.; HUNTER, T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of β -catenin, and enhanced tumor cell invasion. **Cancer Cell**, 4: 499-515, 2003.

MAEDA, G.; CHIBA, T.; AOKA, T.; IMAI, K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. **Odontology**, 95: 24-29, 2007.

MANI, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, 133: 704–715, 2008.

MARCHIÒ, C.; NATRAJAN, R.; SHIU, K.K.; RODRIGUEZ-PINILA, S.M.; TAN, D.S.; LORD, C.J.; HUNGERMANN, D.; FENWICK, K.; TAMBER, N.; MACKAY, A.; PALACIOS, J.; SAPINO, A.; BUERGER, H.; ASHWORTH, A.; REIS-FILHO, J.S. The genomic profile of Her2-amplified breast cancers: The influence of ER status. **Journal of Pathology**, 216: 399-407, 2008.

MARIE, A.; JASEN, C.A.M. E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? **Breast Cancer Research**, 4:2019-2030, 2002.

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.

MCINROY, L.; MAATTA, A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; 360(1): 109-114, 2007.

MENDEZ, M. G.; KOJIMA, S.I.; GOLDMAN, R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. **The FASEB Journal**; 24: 1-14, 2010.

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**, 104:6740–6745, 2007.

MOEBUS V. *et al.* Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study. **Journal of Clinical Oncology**, 28: 2874-2880, 2010.

MOELANS, C.B.; WEGER, R.A.; MONSUUR, H.N.; VIJZELAAR, R. Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes. **Modern Pathology**, 23: 1029-1039, 2010.

MOELANS, C.B.; DE WEGER, R.A.; EZENDAM, C.; VAN DIEST, C.P. HER-2/neu amplification testing in breast cancer by Multiplex Ligation-dependent probe amplification: influence of manual- and laser microdissection. **BMC Cancer**, 9, 2009.

MORROGH, M.; ANDRADE, V.P.; GIRI, D.; SAKR, R.A.; PAIK, W.; QIN, L.X.; *et al.* Cadherin–catenin complex dissociation in lobular neoplasia of the breast. **Breast Cancer Research Treatment**, 132:641–52, 2012.

NASS, S.J.; HERMAN, J.G.; GABRIELSON, E.; IVERSEN, P.W.; PARL, F.F.; DAVIDSON, N.E.; GRAFF, J.R. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5'CpG islands increases with malignant progression in breast cancer. **Cancer Research**, 60:4346-4348, 2000.

NEVE, R.M.; CHIN, K.; FRIDLAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F.L.; FEVR, T, *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, 10:515-27, 2006.

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

NIELSEN, T.O., *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 10(16):5367-5374, 2004.

NIJKAMP, M.M.; SPAN, P.N.; HOOGSTEEN, I.J.; VAN DER KOGEL, A.J.; KAANDERS, J.H.; BUSSINK, J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Radiother Oncologic**, 99:344–8, 2011.

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

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

NOLLET, F.; KOOLS, P.; van ROUY, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **Journal of Molecular Biology**, 299: 551-72, 2010.

OKA, H.; SHIOZAKI, H.; KOBAYASHI, K.; INOUE, M.; TAHARA, H.; KOBAYASHI, T.; TAKEICHI, M. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. **Cancer Research**, 53, 1696-1701, 1993.

OMS. Organização Mundial da Saúde, 2016.

OLIVEIRA, C. *et al.* Quantification of Epigenetic and Genetic 2nd Hits in CDH1 During Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome Progression. **Gastroenterology**, 136:2137–2148, 2009.

OZDAMAR, B.; BOSE, R.; BARRIOS-RODILES, M.; WANG, H.R.; ZHANG, Y.; WRANA, J.L. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. **Science**, 307: 1603-1609, 2005.

PAULIN, R.; GRIGG, G.W.; DAVEY, M.W.; PIPER, A.A. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, 26(21):5009-10, 1998.

PATHEL, 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.

PETITJEAN, *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**. 28(6): 622-9. 2007.

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

PHAROAH, P.D.P.; GUILFORD, P.; CALDAS, C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in *CDH1* (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Official Journal of the Aga Institute**, 121: 1348-1353, 2001.

PLATZER P., *et al.* Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. **Cancer Research**, 62:1134-1138, 2002.

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

- POLIAK, K.; WEINBERG, R. A. transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**. 9(4): 256-73. 2009.
- PORTER, P. “Westernizing” women’s risks? Breast Cancer in Lower-income countries. **The New England Journal of Medicine**, 358: 213-216, 2008.
- RADISKY, D.C. Epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Cell Science**, 118:4325–6, 2005.
- RAPATONI, L. Expressão de CK5 e Vimentina/E-caderina nos diferentes subtipos de carcinomas ductais mamários. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2013.
- RAYMOND, W. A.; LEONG, A. S.-Y. Vimentin a new prognostic parameter in breast carcinoma? **The Journal of Pathology**, 158: 107–114, 1989.
- REIS-FILHO, J.S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J.Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **Journal Clinical of Pathology**, 59: 225-231, 2006.
- REIS-FILHO, J.S.; PUSZTIAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**, 378: 1812-1823, 2011.
- 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 Ricostrutiva. **Piccin Nuova Libreria**, 1: 343-344, 2009.
- RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, 1503, 2006.
- SARRIO, D.; RODRIGUEZ-PINILLA, S.M.; HARDISSON, D.; CANO, A.; MORENO-BUENO, G.; PALACIOS, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Research**, 68:989–997. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2017, 2008.
- SARRIO, D.; MORENO-BUENO, G.; HARDISSON, D.; SANCHEZ-ESTÉVEZ, C. *et al.* Epigenetic and genetic alterations of *APC* and *CDH1* genes in lobular breast cancer: Relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. **International Journal of Cancer**, 106:208-215, 2003.

SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and Molecular Life Science**, doi:10.1007/s00018-011-0735-1, 2011.

SCHIETKE, R.D.; BROHL, T.; WEDIG, N.; MUCKE, H.; HERRMANN, T.M. Magin Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis. **Europe Journal Cell Biologic**, 85: 1–10, 2006.

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.

SHAPIRO, L. *et al.* Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. **Nature**, 374:327-37, 2000.

SHIMONO, Y. *et al.* Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. **Cell** 138, 592–603, 2009.

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.

SHRIVER C.D., HUEMAN M.T., ELLSWORTH R. Molecular signatures of lymph node status by intrinsic subtype: gene expression analysis of primary breast tumor from patients with and without metastatic lymph nodes. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 33: 1-6, 2014.

SIITONEN, S.M.; KONONEN, J.T.; HELIN, H.J.; RANTALA, I.S.; HOLLI, K.A.; ISOLA, J.J. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. **American Jorunal Clinical Pathologic**, 105: 394–402, 1996.

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.

SINGLETERY, 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.

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.

SOMMERS, C.L.; BYERS, S.W.; THOMPSON, E.W.; TORRI, J.A.; GELMANN, E.P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research Treatment**, 31(2–3):325–335, 1994.

SORLIE, T.; WANG, Y.; XIAO, C.; JOHNSEN, H.; NAUME, B.; SAMAHA, R.R.; BORRESEN-DALE, A.L. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer:

gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, 7: 127, 2006.

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.

SOUSA, B.; PAREDES, J.; MILANEZI, F.; LOPES, N.; MARTINS, D.; DUFLOTH, R.; VIEIRA, D.; ALBERGARIA, A.; VERONESE, L.; CARNEIRO, V.; CARVALHO, S.; COSTA, J.L.; ZEFERINO, L.; SCHMITT, F. P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. **Histology Histopathology**, 25: 963–974, 2010.

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.

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.

SUN, Q. *et al.* Covariation of copy number located at 16q22.1: New evidence in mammary ductal carcinoma. **Oncology Reports**, 28: 2156-2162, 2012.

TAM, W.L.; WEINBERG, R.A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature Medicine**, 19: 1438-1449, 2013.

TANG, D.; XU, S.; ZHANG, Q.; WANG, J.; LU, K.; SONG, Y. *et al.* The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple negative breast cancer. **Medicine Oncology**, 29:526–33, 2012.

TANG, Y.C.; AMON, A. Gene copy number alterations: A cost-benefit analysis. **Cell**, 152: 394-405, 2013.

TAVARES, J. S. C.; TRAD, L. A. B. Estratégias de enfrentamento do câncer de mama: um estudo de caso com famílias de mulheres mastectomizadas. **Ciência e Saúde**, 15, 1349-1358, 2010.

THIERY, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Review Cancer**, 2:442–54, 2002.

THIERY JP, ACLOQUE H, HUANG RY, NIETO MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, 139:871-890, 2009.

- THOMPSON, E.W.; PAIK, S.; BRUNNER, N., et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. **Journal of Cell Physiology**, 150(3):534–544, 1992.
- TIEZZI, D.G.; FERNANDEZ, S.V.; RUSSO, J. Epithelial mesenchymal transition during the neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogen. **International Journal of Oncology**, 31: 823-827, 2007.
- TOMASETTI, C; LI, L. VOLGESTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology and cancer prevention. **Science**, 355(63310): 1330-1334, 2017.
- TRIMBOLI, A.J. *et al.* Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. **Cancer Research**, 68(3): 937-945, 2008.
- TURASHVILI, G. *et al.* Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. **BMC Cancer**, 7:55, 2007.
- USAMI, Y.; SATAKE, S.; NAKAYAMA, F.; MATSUMOTO, M.; OHNUMA, K.; KOMORI, T. *et al.* Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes esophageal squamous cell carcinoma motility and progression. **Journal Pathologic**, 215(3):330-9, 2008.
- VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling Breast Cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, 659-72, 2007.
- VERGARA, D.; MERLOT, B.; LUCOT, J.P.; COLLINET, P.; VINATIER, D.; FOURNIER, I. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. **Cancer Letters**, 2009.
- 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**, 21: 59-60, 2009.
- VONA-DONIS, L.; ROSE, D.P. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. **Elsevier**, 20: 193-201, 2009.
- VUORILUOTO, K.; HAUGEN, H.; KIVILUOTO, S.; MPINDI, J.P.; NEVO, J.; GJERDRUM, C.; TIRON, C.; LORENS, J.B.; IVASKA, J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. **Oncogene**, 30(12):1436–1448, 2011.
- 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.
- ZAJCHOWSKI, D.A.; BARTHOLDI, M.F.; GONG, Y. *et al.* Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. **Cancer Research**, 61(13):5168–5178, 2001.

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.

ZHANG, J.; MA, L. MicroRNA control of epithelial– mesenchymal transition and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, 31: 653–662, 2012.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. **Molecular Cancer Research**, 8: 629-642, 2010.

YANG, J., AND WEINBERG, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental Cell**. 14: 818–829, 2008.

WHITEHEAD, R.H.; BERTONCELLO, I.; WEBBER, L.M.; PEDERSEN, J.S. A new human breast carcinoma cell line (PMC42) with stem cell characteristics. I. Morphologic characterization. **Journal of the National Cancer Institute**, 70(4):649–661, 1983.

WHITEHEAD, R.H.; QUIRK, S.J.; VITALI, A.A.; FUNDER, J.W.; SUTHERLAND, R.L.; MURPHY, L.C. A new human breast carcinoma cell line (PMC42) with stem cell characteristics. III. Hormone receptor status and responsiveness. **Journal of the National Cancer Institute**, 73(3):643–648, 1984.

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.

WEI, J.; XU, G.; WU, M.; ZHANG, Y. *et al.* Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. **Anticancer Research**, 28:327–34, 2008.

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

WEIGELT, B. *et al.* The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. **Journal Pathologic**, 220:45–57, 2010.

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.

WELLNER, U. *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. **Nature Cell Biology**. 11: 1487–1495, 2009.

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

Epithelial-mesenchymal transition in cancer: An overview

Fabiano Santos Ramos, Letícia Wenz, Iglenir João Cavalli and Enílex M.S.F. Ribeiro*

Department of Genetics, Federal University of Paraná, Brazil

Abstract

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a complex developmental program that enables carcinoma cells to suppress their epithelial features changing to mesenchymal ones. This change allows cells to acquire mobility and the capacity to migrate from the primary site. EMT provides a new insight for understanding the several steps of the metastatic process, from dedifferentiation to a more aggressive phenotype. In this review, we provide a summary of the historical and recent insights into the role of EMT in cancer metastasis, including the main biomarkers already described, the new potential biomarkers, as well as the role of EMT for resistance to therapies.

From transformation to transition

Our body is formed by cells of different types and functions. In this review, we will approach a phenomenon that occurs between two specific types, epithelial and mesenchymal. Epithelial cells are highly adhered by intercellular adhesion complexes differing from mesenchymal ones, which are nonpolar and have junctions that allow for greater mobility between cells [1]. These two types of cells are involved in the process known as epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is a normal phenomenon that occurs mainly in the embryonic stage [2]. Elizabeth Hay (1985) made the first descriptions of the process more than 40 years ago in studies *in vivo* with chickens; she observed the transformation of epithelial into mesenchymal cells. Later, this phenomenon ceased to be considered exclusively embryonic, as it was also present in other processes that required greater cellular mobility and thus increased migratory capacity, such as the healing process and even the progression of cancer [3]. The term transition started to be used due to the reversibility of the process (EMT-MET). EMT can be classified in three types according to the process involved: type 1 for gastrulation and embryogenesis, type 2 for regeneration and wound healing and type 3 for carcinogenesis (metastasis, malignancy and invasion) [4].

Cell plasticity and EMT

Cell plasticity is observed to be a collective migration process, in which epithelial cells move in a connected way both physically and functionally [5]. This phenomenon has been identified as a critical process especially during the embryogenesis of the mammary gland [6], intestinal differentiation [7] and the healing process [8]. Cellular plasticity that occurs in development processes suggests that differences between epithelial and mesenchymal cells are more likely to be a continuum spectrum than two different cell states. In mammals, EMT and metaplasia are targets of epithelial cell plasticity studies [9]. Metaplasia is a spontaneous process in which a particular differentiated cell type converts into another without the need of cell division. The term transdifferentiation is used by cell biologists and, in spite of being more common in amphibians, it has also been observed in mammals among ileal cells, hepatocytes, lactotrophs and pneumocytes [9].

EMT and the metastatic process

Metastasis is a process defined when cells of the primary tumor break off, entering the bloodstream and/or lymph vessels and settling at a secondary site. EMT is paramount for this phenomenon, being considered a promoter of metastasis, due to the transformations through which cells acquire mobility, a mesenchymal feature. The metastatic process associated with mesenchymal features are displaying in a huge variety of cancers, including the most aggressive cancer subtypes [10]. This association is corroborated by many reports linking EMT and disease progression [11-14].

Metastasis is a complex process and many points are still not well understood but it is well-recognized that it consists in several steps [15]. Detachment is the first step in metastasis, in which the cells of the primary tumor lose contact with each other and become mobile owing to the mesenchymal acquisition triggered by EMT. Subsequently, the cells are able to invade neighboring tissues and the basal membrane (invasion phase) reaching the blood and lymphatic vessels, thus characterizing the stage of intravasation where no more epithelial characteristics are observed. Some cells exit the vessels by the process of extravasation, reaching other organs called secondary sites. Not all the cells go through these stages, but those that are fixed can proliferate in this new environment, reaching the stage of colonization and forming micrometastases; this may give rise to the secondary tumor [16]. Some studies demonstrated that cells from the primary and secondary tumors share a similar epithelial nature and that in many tumors such as breast, prostate, colorectal and lung, the cells from the secondary tumor were less differentiated than their counterparts [16]. This observation was incompatible with the EMT theory and a reverse process (MET) was suggested as part of the metastatic tumor formation [17].

Correspondence to: Enílex MSF Ribeiro, M.D., Ph.D., Senior Professor, Department of Genetics, Federal University of Paraná, P.O. box 19071, code 81520-990, Curitiba, Paraná, Brazil. Tel: +55-41-33611555, Fax: +55-41-33611753, E-mail: eribeiro@ufpr.br

Key words: biomarkers, cancer, epithelial-mesenchymal-transition, metastasis

Received: May 12, 2017; *Accepted:* June 20, 2017; *Published:* June 23, 2017

Some hypotheses try to explain the relationship between EMT and metastasis. One of the strongest hypotheses is that tumor cells are in different stages, and consequently cells at different stages can enter into EMT, evolving to more advanced degrees of the tumor.

Tumor microenvironment involved in EMT

The tumor microenvironment comprises several cell types, such as inflammatory and immune cells, extracellular matrix components (ECM), cancer associated fibroblasts (CAFs), endothelial and epithelial cells, pericytes, mesenchymal stem cells, etc. It plays an important role in tumor progression, induction of EMT, and cancer metastasis. The alteration of phenotypes that occur in EMT in tumor cells involves several extracellular signaling such as TGF- β , NF- κ B and Wnt [18]. Cellular plasticity of tumor cells is important for its adaptation to the microenvironment changes between the primary site and the site of colonization. Therefore, heterotypic interactions are established to determine the course of tumor progression and metastasis [19-21].

Immune cells derived from bone marrow are able to infiltrate the primary tumor, inducing EMT by TGF- β , EGF and HGF from several signaling pathways [22]. Platelet-derived TGF- β and direct contact of immune cells with tumors synergistically activate two signaling pathways in cancer cells, TGF- β /Smad and NF- κ B, leading to an alteration of the mesenchymal phenotype and to the initiation of the metastatic process *in vivo*. Inhibition of NF- κ B signaling in cancer cells or ablation of the expression platelet TGF- β expression may promote protection against the development of lung metastasis *in vivo* [22].

In co-culture of breast tumor cells with bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) a significant positive regulation of specific EMT markers such as N-cadherin, Vimentin, Twist and Snail and negative regulation of E-cadherin expression was observed [23]. Thus, this group of cells can promote metastasis in breast cancer through the facilitation of the EMT process. Another cell type that may contribute to tumor progression through EMT induction is tumor associated macrophages (TAM). Borden *et al.* [24] demonstrated that through the signaling of TGF- β and activation of the β -catenin pathway these cells can induce EMT in the intra-tumor environment. When the gene and protein expressions associated with EMT and macrophages were analyzed, these authors found a positive correlation between TAM density and expression of mesenchymal markers, activation of β -catenin pathway, increase of mesenchymal markers expression, decrease of E-cadherin expression, and an invasive phenotype. Other components such as CAFs have also been shown to participate in EMT. CAFs can be activated by Interleukin 6 (IL-6) and, through secretion of metalloproteinases, they induce EMT in tumor cells being related to aggressiveness [25]. IL-6 is considered to be an inducer of EMT phenotype in breast cancer cells, with the cells exhibiting increased levels of Interleukin- 6 (IL-6) according to the increase in tumor grade and poor survival of the patient [25]. In addition, Sullivan *et al.* [26] have observed E-cadherin repression by IL-6 in positive estrogen receptor (ER+) breast cancer cells, corroborating the findings of IL6 as an EMT inducer.

The identification of specific modulators that act in signaling pathways inducing EMT helps to elucidate the triggering of this process. Consequently, many of these molecules have been used as biomarkers.

The main biomarkers for EMT

Biomarkers are widely used in EMT studies to characterize the state in which cells are found. In addition to the level of expression, the distribution and function of proteins can also be altered, allowing them

to be used as biomarkers. Some are already well-related to this process, such as growth factors (TGF- β and Wnt), transcription factors (SNAIL and TWIST), adhesion molecules (cadherins) and molecules present in the cytoskeleton (vimentin) [17].

TGF- β is considered one of the first inducers of EMT and an important suppressor of epithelial cells [27]. It stimulates cells to lose epithelial markers, such as E-cadherin, and also to gain mesenchymal markers, such as vimentin. TGF- β is related to cell proliferation, and when this growth factor is mutated it contributes to the uncontrolled proliferation of cancer cells [28]. Another important transcription factor for EMT called Snail, which is induced by TGF- β , controls the expression of proteins with the mesenchymal phenotype and represses epithelial proteins such as E-cadherin; its overexpression may induce to the transition process. Snail also has other targets that are related to cell polarity, cell cycle and apoptosis [29]. In addition, this protein is able to promote the migration and differentiation of epithelial cells, and in the embryonic stage it promotes mesoderm formation [30]. Like Snail, Twist (also a transcription factor) is related to the migration and differentiation of epithelial cells into the mesenchymal phenotype. The phenomenon known as "cadherin exchange" is influenced by Twist, in which it regulates the shift from E-cadherin to a less adhesive N-cadherin; through E-cadherin production is repressed while N-cadherin is stimulated. N-cadherin also acts on the intracellular adhesion system and is a characteristic cadherin in mesenchymal cells [31].

In addition, the expression of β -catenin and the loss of CDH1 expression are also associated with the mesenchymal stages [30,32,33]. The levels of cadherins (E-cadherin and N-cadherin) are commonly evaluated to monitor EMT, and the reduction or even loss of their function is widely used in monitoring the evolution of the mesenchymal stage of cancer cells [34]. The gene encoding E-cadherin (CDH1) usually has its expression diminished by epigenetic factors such as repression of transcription factors and methylation of the CpG islands [35]. CDH1 can also be mutated and present a nonfunctional protein [36].

In breast cancer, alterations such as loss of differentiation characteristics, tumor grade, metastasis, poor prognosis and invasiveness are inversely correlated with the levels of E-cadherin [37,38], so that changes in expression of E-cadherin have been used as a tumor progression monitor. It is also possible that it has a more significant role in the MET process due to the transition between E-cadherin and N-cadherin [39].

E-cadherin expression is also affected by the Wnt signaling pathway that regulates the transcription of genes that control cell proliferation, differentiation and migration, and its expression is identified by high β -catenin concentrations. The presence of Wnt/ β -catenin signaling is observed in more advanced cases with worse prognosis [40].

Some biomarkers help identify the EMT phases. The acquisition of mesenchymal markers such as vimentin, the collagen-specific tyrosine kinase receptor, tyrosine kinase 2 receptor discoidin domain (DDR2) and fibroblast-specific protein 1 (S100A4) by epithelial cells have been described well [41,42]. Vimentin is an intermediate filament, usually found in migratory processes and expressed in several cell types [43,44]. The increased expression of vimentin has already been observed in several carcinomas such as breast, prostate, colon and oral mucosa, associated with increased invasiveness and metastasis [44,45]. For example, when analyzed in patients with breast cancer in advanced disease stage (Bloom Richardson scores 8 and 9) and with negative progesterone receptors (PR-), vimentin showed a significantly increased expression [44]. Studies in breast cancer cell lines displaying

different degrees of invasiveness demonstrated the expression of vimentin being regulated by Smad interacting protein 1 (SIP1), revealing a new pathway that may contribute to metastatic progression [46]. These results demonstrate that the vimentin expression may be used as a biomarker to predict factors such as disease-free survival and overall survival in breast cancer [44].

Attempt to explain reversible EMT through microRNAs and epigenetics

One of the main paradigms of the evolution of carcinogenesis is that metastasis is originated from irreversible mutations. Some researchers propose that the processes of carcinogenesis may be derived from reversible epigenetic processes [47,48]. These epigenetic changes involve DNA methylation, histone modifications, and changes in the expression of microRNAs (miRNAs) – small molecules of non-coding RNA that act as a post-transcriptional mechanism in the expression of genes, blocking translation or promoting mRNA degradation.

Many miRNAs are located in regions more susceptible to deletions, amplifications and recombination. These changes correlate miRNAs with processes that regulate cell division, apoptosis, angiogenesis; factors directly linked to the development and progression of cancer [49]. Many miRNAs have been described as tumor suppressors and oncogenes depending on the target mRNA. Several types of EMT regulation are studied, but in recent years, with the observation of the association of tumor transition and progression, miRNAs have gained importance because they are described as agents capable to influence the mesenchymal and epithelial phenotypes [50].

Many miRNAs are related as important regulators of EMT. The miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-141 and miR-429) have been described as epithelial markers with important function in this process by suppressing the change of epithelial cells to mesenchymal by targeting the ZEB1 and ZEB2 mRNAs, thus changing their expression. ZEB1 and ZEB2 proteins are members of the zinc-finger family E-box-binding homeobox factor (ZEB) and are characterized as being transcriptional repressors. These repressors induce EMT by repressing the expression of E-cadherin, contributing to tumor progression [51]. The variation in miR-200 expression directly influences TGF- β , and the expression ratio between them is inversely related. The high expression of miR-200 has the ability to block TGF- β , which in turn does not induce EMT. The miR-200 family also influences the concentrations of markers such as vimentin, where its inhibition increases the levels of the mesenchymal marker [50]. *Hsa-mir-9* shows a strong relationship with EMT markers, mainly targeting the CDH1 gene, which encodes E-cadherin [49]. *Mir-9* can reduce E-cadherin expression by up to 70% and at the same time it increases the expression of vimentin by inducing EMT. In primary breast tumors, *mir-9* is overexpressed when there is presence of metastasis [50]. Inhibition of *mir-9* resulted in low migration and invasion into M12 cell lines, as well as low tumor growth and metastatic indices in nude mice, indicating that *mir-9* acts as an oncomiR [51]. According to Li Ma et al. [52], *mir-9* activation β -catenin signaling that contributes to vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in SUM149 and not SUM159 cell lines. In the MCF7-RAS line, *mir-9* inhibited E-cadherin expression and induced VEGF-induced tumor angiogenesis, indicating the ability of miRNA to modulate E-cadherin expression. Another miRNA that is overexpressed in the presence of metastasis is the miR-10b identified by microarray in mammary carcinomas [53]. Inhibition of miR-10b in rodents decreased invasiveness, and its high expression promoted mobility in non-invasive cells. One of the most described miRNAs in

several tumors is miR-21, which is also correlated with the metastatic process. Its inhibition decreases the invasiveness of cells *in vitro* and in lung tissues with metastasis in rats [50]. The miR-30 family is often found in several tumors with low expression and miR-30a has the VIM gene as a target in which it binds the 3'UTR region. In the study by Cheng et al. [54], the high expression of miR-30a is related to a decrease in migration and invasiveness of breast neoplastic cells. The high expression of miR-30a has recently been described as being related to the inhibition of the mobility of lung tumor cells because there is a decrease in the expression of Snail, a transcriptional regulator that represses E-cadherin expression during EMT [54].

Mir-155 is commonly found with a high expression in several cancers [55,56]. The study made by He et al. [57] found miR-155 inversely correlated with HER2 expression in breast tumors. *HER2*, in turn, is a gene that plays an important role in malignant tumor progression and may be inhibited by miR-155 expression in breast cancer cells.

Other epigenetic mechanisms, such as CpG promoter methylation and histone modification, also play a role in the regulation of EMT as main regulators of several transcription factors linked to EMT program, including *Twist*, *Snail*, *Slug* and target genes such as *CDH1* [58]. The hypermethylation of the *CDH1* promoter has been observed in mammary carcinomas leading to a decrease in E-cadherin expression favoring the mesenchymal phenotype [59].

Treatment with demethylating agents causes the re-expression of E-cadherin [60]. Another important example is the polycomb group (PcG) proteins PRC1 and PRC2. They are epigenetic regulators that act as repressors and have a key role in regulating the expression of E-cadherin and a variety of proteins [60]. During cancer evolution, the elevated expression of certain PRC2 subunits is thought to drive malignant progression through an EMT program [61] by repressing key genetic targets, including *CDH1*. Therefore, PcG proteins can drive tumor development controlling the different phenotypic states of cancer cells.

EMT and resistance to therapies

EMT is clearly associated with therapy resistance and metastasis. The role of EMT is evident in several tumors, including prostate [62] and pancreatic tumors [63]. The stem cell features acquired in EMT processes are an important focus of current research and must be considered when choosing therapeutic intervention [64]. Several lines of research try to target the aggressive traits of the dedifferentiated cells, including strategies designed to reverse the program by inducing a MET [65]. The idea behind this strategy is the reestablishment of the epithelial state with the consequent loss of stem-like properties. Molecules involved in the maintenance of cell adhesion, polarity and the interaction with the basal membrane are good candidates as targets [66-68].

Several efforts have been made to better understand the signaling pathways involved in the maintenance of cancer cells in the stem cell state and to directly target them. Factors such as prostaglandin 2 (PGE2) secreted by mesenchymal stem cells, together with cytokines, induce a stem cell state and create a favorable niche [69]; canonical pathways such as NF- κ B and PI3K-AKT also contribute to reveal new targets including the trophoblast cell surface antigen 2 (TROP2), which regulate the PI3K-AKT pathway, thus inducing EMT in gallbladder cancer [70]. In breast cancer, the expression of *Twist* has been shown to be related to drug resistance. *Twist* transcriptionally upregulates *AKT2* which increases migration, invasiveness and paclitaxel resistance. When *AKT2* was silenced, the resistance of paclitaxel was reduced [71].

Also, the overexpression of Twist promotes hormone resistance to the estrogen receptor modulator (SERM) tamoxifen and to the selective estrogen receptor down-regulator [72]. Breast cancer ER-positive cell line MCF-7 became resistant to tamoxifen when the EMT morphology was induced (loss of cell-cell junctions and change in the morphology) [73]. Furthermore, the EMT-like phenotype with HER2 overexpression is resistant to trastuzumab [74].

In summary, the disruption of these paracrine and autocrine signaling pathways can induce a more differentiated and susceptible-to-therapy epithelial state.

Conclusion

Our understanding of the role of EMT/MET-related processes in cancer evolution has dramatically increased, with several studies strongly supporting the notion that EMT is a key mechanism for effective metastatic dissemination. Many main factors that drive EMT are now recognized, as reviewed in this article, but further research is necessary to identify all the components of this complex program. This knowledge will have a huge impact on the identification of new markers for disease severity and potential for recurrence. Another aspect of great importance is the development of new therapies, based on the notion by targeting the EMT-related mechanisms one can hold the cells in an epithelial state that is unfavorable for tumor progression.

Financial support

This research was partly supported by CNPq and CAPES.

References

- Adcocks H, Adams MB, Fidler IJ, Brummer-Forsberg M, Nishi MA (2009) Epithelial-mesenchymal transition: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119: 1438-1448. [Crossref]
- Gao F, Parker-Kerrigan BC, Yang D, He L, Shantsevich I, et al. (2014) Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transition. *J Hematol Oncol* 7: 19. [Crossref]
- Schmidhaer K, Eder S, Schneider AJ, Schulz J (2014) Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Transl Med* 3: 1-12. [Crossref]
- Pant A, Pines CM (2011) Deconstructing the molecular portrait of breast cancer. *Acta Oncol* 5: 5-28. [Crossref]
- Chaffer CL, Luu Juan BP, Liu R, Weinberg RA (2016) EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 35: 643-654. [Crossref]
- Ye X, Tian WL, Shiota T, Koyanagi Y, Reinhardt F, et al. (2015) Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumor-initiating cells. *Nature* 525: 256-260. [Crossref]
- Barker N, van de Wetering M, Clevers H (2008) The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22: 1856-1864. [Crossref]
- Martin F, Pechoux JM (2004) Parallels between tumor repair and embryonic morphogenesis. *Development* 131: 3021-3034. [Crossref]
- Zelinger M, Nelson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1429-1437. [Crossref]
- Sciacca M, Antonacci C, Ciliberto D, Bartolotta R, Russo MG, et al. (2016) Emerging prognostic markers related to mesenchymal characteristics of poorly differentiated breast cancers. *Tumor Biol* 37: 5427-5435. [Crossref]
- Micalizzi DS, Ford HL (2008) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer. *Nature Oncol* 5: 1129-1140. [Crossref]
- Wang Y, Zhou SP (2013) Epithelial-mesenchymal transition — A hallmark of breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 32: 39-49. [Crossref]
- Barrondo C, Flor J, Kucharev V, Gilbert A, Orsini T, et al. (2016) Expression of the Long Non-Coding RNA HOTAIR Correlates with Disease Progression in Bladder Cancer and is Confined to Bladder Cancer Patient Urinary Exosomes. *PLoS One* 11: e0147286. [Crossref]
- De Craen SO, Barré G (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13: 99-110. [Crossref]
- Yao D, Dai C, Peng S (2011) Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Acta Cancer Res* 9: 1609-1620. [Crossref]
- Tsai JS, Yang J (2013) Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* 27: 2193-2206. [Crossref]
- Thompson EW, Neugebauer DF, Tash D (2005) Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 65: 5991-5995. [Crossref]
- Yeo JC, Kalluri R (2007) Mechanisms of metastatic epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cellular Biochem* 101: 816-829. [Crossref]
- Théry JP, Adcocks H, Huang KY, Nishi MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 138: 871-891. [Crossref]
- Gao D, Veldre LT, Wang S, Chang JC, Mittal V (2012) Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cancer Res* 72: 6083-6089. [Crossref]
- The B, Wang X, Knutts I, Sim W J, Khoo K, et al. (2011) Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by epithelial-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol* 9: 1-15. [Crossref]
- Labella M, Beggs S, Ryan BD (2011) Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20: 576-590. [Crossref]
- Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy SD, et al. (2010) Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumor microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 124: 317-326. [Crossref]
- Bondle AK, Tschiller V, Knaus S, Schmitt A, Schwendener RA (2012) Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 12: 1-8. [Crossref]
- Glasson E, Bianchini F, Mariani L, Sordi S, Trossi F, et al. (2010) Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 70: 6945-6956. [Crossref]
- Sullivan NJ, Sauer AK, Axel AR, Varrault P, Roman V, et al. (2008) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28: 2940-2947. [Crossref]
- Pickup M, Novitskiy S, Moses HL (2013) The roles of TGF β in the tumor microenvironment. *Nat Rev Cancer* 13: 789-799. [Crossref]
- Dallan N, Pasche B (2010) TGF- β signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res* 125: 85-103. [Crossref]
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 178-186. [Crossref]
- Fidler IJ, Foxe G (2008) The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol* 9: 616. [Crossref]
- Vahtinen S, Laikka R, Sahlgren C, et al. (2001) The expression of intermediate filament protein vimentin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neurocytol Exp Neurol* 60: 388-399. [Crossref]
- Toth I, Andras C, Molnar C, Tanyi M, Csiki Z, et al. (2012) Investigation of beta-catenin and E-cadherin expression in Dukes B2 stage colorectal cancer with tissue microarray method. Is it a marker of metastatic potential in rectal cancer? *Pathol Oncol Res* 18: 429-437. [Crossref]
- Kim SA, Inamura K, Yamazaki M, Nishihara R, Miwa K, et al. (2016) Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumor growth and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 114: 199-206. [Crossref]
- Struhs F, Zelinger M, Zydzik FN, Yang CQ, Kalluri R, et al. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61: 1714-1728. [Crossref]
- Egiz A, Akguz K, Sankaroglu S, Durgun B, Ozbek S, et al. (2005) DeltaNp71 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24: 2375-2385. [Crossref]
- Théry JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454. [Crossref]

37. Rajeev S, Vinayak WP, Saroj RJ, Shital DP, Mahand RT, et al. (2011) E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci* 3: 227-230. [Crossref]
38. Heilmann R, Liu F, McFalls R, Hellman S (2008) Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 68: 298-304. [Crossref]
39. Gerold K, Halverson CE, Heston SA and Akalin LA (2007) A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13: 7055-7061. [Crossref]
40. Wang Y, Zhou RP (2011) Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Clin J Cancer* 16: 603-611. [Crossref]
41. Ren T, Zhang W, Liu X, Zhao H, Zhang J, et al. (2014) Nicotinamide receptor 2 (NDR2) promotes breast cancer cell metastasis and the mechanism implicates epithelial-mesenchymal transition program under hypoxia. *J Pathol* 235:525-537. [Crossref]
42. Frolkina V, Zellinger K, Weidh UH (2003) Identification of genes associated with the invasive status of human mammary carcinoma cell lines by transcriptional profiling. *Tumor Biol* 24: 189-196. [Crossref]
43. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-1428. [Crossref]
44. Patel NA, Patel PS, Vora NH (2015) Role of PRL-1, Snail, Cytokeratin and Vimentin expression in epithelial mesenchymal transition in breast carcinoma. *Breast Dis* 25: 113-127. [Crossref]
45. Lahtinen L, Kotola K, Mäkelä R, Mjintä JP, Vilkko M, et al. (2013) High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD3 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* 4: 48-61. [Crossref]
46. Rindela S, Munday M, Vandermelle C, Jacobs N, Veldin L, et al. (2006) Regulation of vimentin by SFP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 25: 4975-4985. [Crossref]
47. Housman G, Elyse S, Heston S, Lapinska K, Longene M, et al. (2014) Drug resistance in cancer: an overview. *Cancer (Basel)* 5: 1789-1792. [Crossref]
48. Heston S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Robinson S, et al. (2014) Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Gene Epigenet* 5: 9-19. [Crossref]
49. Zhang J, Ma L (2012) MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31: 659-662. [Crossref]
50. Bruden CP, Gregory PA, Khan-Goodall Y, Goodall GJ (2009) The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci* 65: 1892-1899. [Crossref]
51. Chu PY, Ho FW, Yu CC, Tsai LL, Yu CH, et al. (2013) Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and metastatic tumor-initiating properties in head and neck cancer. *Oval Oncol* 49: 34-41. [Crossref]
52. Ma L, Young J, Prabhala H, Fan E, Munday P, et al. (2010) miR-9, a MYCN/MYC-associated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Mol Cell Biol* 30: 267-276. [Crossref]
53. Bullock MD, Sayan AE, Prabhala GK, Mizutani AH (2012) MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression. *Biol Cell* 104: 3-12. [Crossref]
54. Cheng CW, Wang HW, Chang CW, Chu HW, Chen CY, et al. (2012) MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134: 1081-1089. [Crossref]
55. Yang M, Shen H, Qiu C, Ni Y, Wang L, et al. (2013) High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavorable survival in cervical cell lung cancer. *Eur J Cancer* 49: 606-615. [Crossref]
56. Gasparini F, Lovat F, Farnas M, Casadei I, Casloni L, et al. (2014) Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 4536-4541. [Crossref]
57. Ho XH, Zhu W, Yuan F, Jiang S, Li D, et al. (2016) miR-155 downregulates E-cadherin and suppresses E-cadherin-induced malignant transformation of breast epithelial cells. *Oncogene* 35: 6013-6025. [Crossref]
58. Louisaerts M, van Waa T, Philippe K, Dierckx JW, Zimmermann R, et al. (2006) E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 5: 661-671. [Crossref]
59. Kisselick T, Riddler M, Nusslein D (2013) Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Mol Clin Oncol* 1: 3-11. [Crossref]
60. Tam WJ, Weinberg RA (2012) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 1458-1470. [Crossref]
61. Oza F, Hart EM, Matthews LA, Cabranes SM, Sun L, et al. (2011) Pharmacologic disruption of polycomb repressor complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol Cancer* 10: 1-15. [Crossref]
62. Zhou T, Hartel A, Abulmasmoum PA (1998) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma during hormonal treatment. *Urology* 51: 585-589. [Crossref]
63. Aramganes T, Ramachandran V, Francis KF, Wang H, Marjari L, et al. (2009) Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 69: 5828-5834. [Crossref]
64. Smith EN, Shownick NA (2016) Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J Clin Med* 5. [Crossref]
65. Parakkianan DR, Weinberg RA (2016) Targeting the Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Case for Differentiation-Based Therapy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 81: 11-19. [Crossref]
66. Jaume A, Gottardi CJ, Yap AS (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27: 6920-6929. [Crossref]
67. Luo M, Vlodavsky V (2008) Cell polarity and cancer-cell and tissue polarity as a non-metastatic tumor suppressor. *J Cell Sci* 121: 1141-1150. [Crossref]
68. De Aramganes A, Hamada H, Alpy F, Normand S, Bouysset E, et al. (2016) Hemidesmosomes integrity protects the cells against cadherin and cadherinectin cancer. *Gut*. [Crossref]
69. Schmal C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, et al. (2011) Pten/Notch and anterior signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145: 926-940. [Crossref]
70. Li X, Teng S, Zhang Y, Zhang W, Zhang X, et al. (2017) TROP2 promotes proliferation, migration and metastasis of gallbladder cancer cells by regulating PI3K/AKT pathway and inducing EMT. *Oncotarget*. [Crossref]
71. Cheng GZ, Chen J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, et al. (2007) Twist transcriptionally up-regulates AKT3 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 67: 1899-1897. [Crossref]
72. Yoneda K, Link A, Kimble R, Dorek J, Kato Y, et al. (2012) Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by down-regulating estrogen receptor alpha. *Oncogene* 31: 3223-3234. [Crossref]
73. Hincor S, Jiang WG, Obermair K, Taylor K, Morgan L, et al. (2005) Transferrin resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behavior and involves modulation of E-cadherin phosphorylation. *Int J Cancer* 118: 298-301. [Crossref]
74. Wu Y, Glincher C, Kim J, Mishra N, Chung S, et al. (2012) Expression of Wnt3 and ventral Wnt3-cadherin pathway and promotes EMT-like phenotype in transcriptional-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 10: 1597-1606. [Crossref]

Copyright ©2017 Ramos PS. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

Nome do Estudo: “Análise das alterações dos genes *CDH1* e *VIM* e sua associação com a transição epitelial mesenquimal (TEM) em carcinomas primários de mama”.

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial. E, entendendo 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

ANEXO II

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 microlitros. 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_L

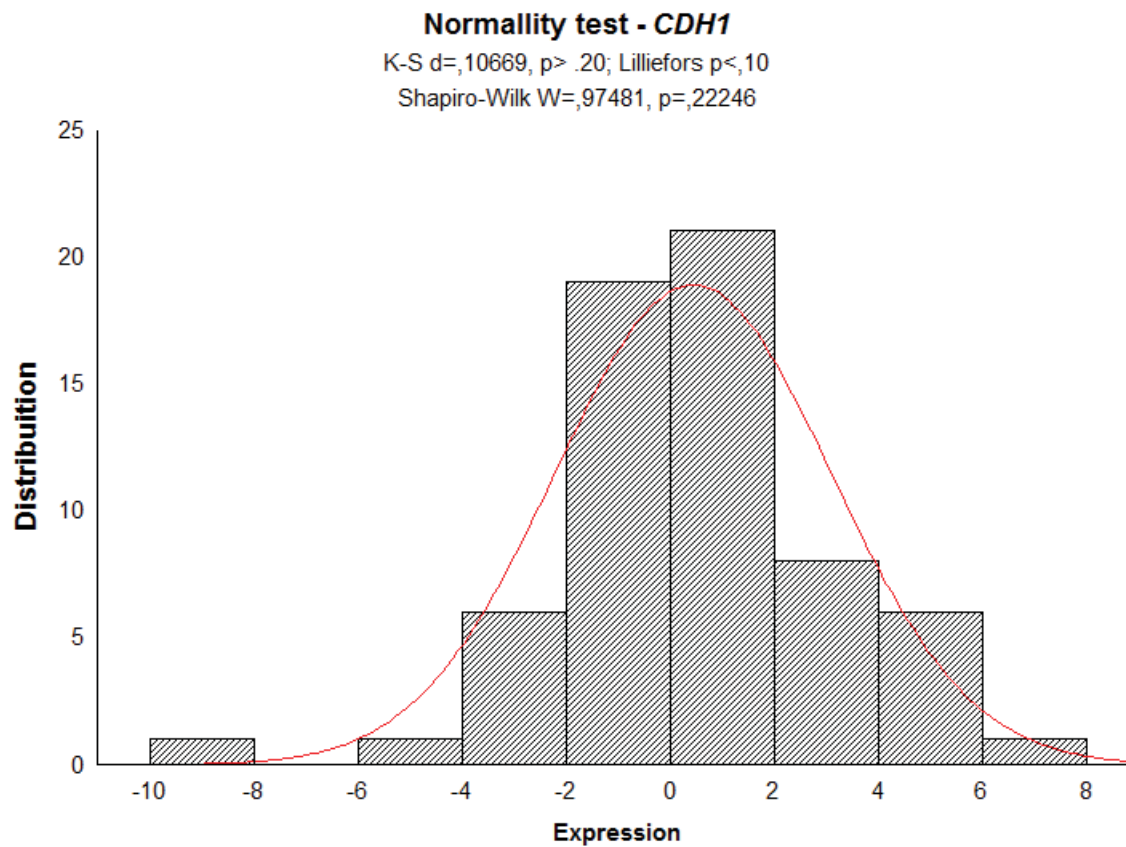
OGIN, e estão representados na FIGURA 6. Os genes candidatos mais estáveis apresentam os menores *scores*, sendo eles *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB*.

Nome do Gene	Símbolo	ID	Tamanho (pb)
18S Ribosomal RNA	18 S	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/ciclophypin 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
Transferin 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

ANEXO III

GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO DA CURVA DE NORMALIDADE PARA AS AMOSTRAS DE EXPRESSÃO GÊNICA.

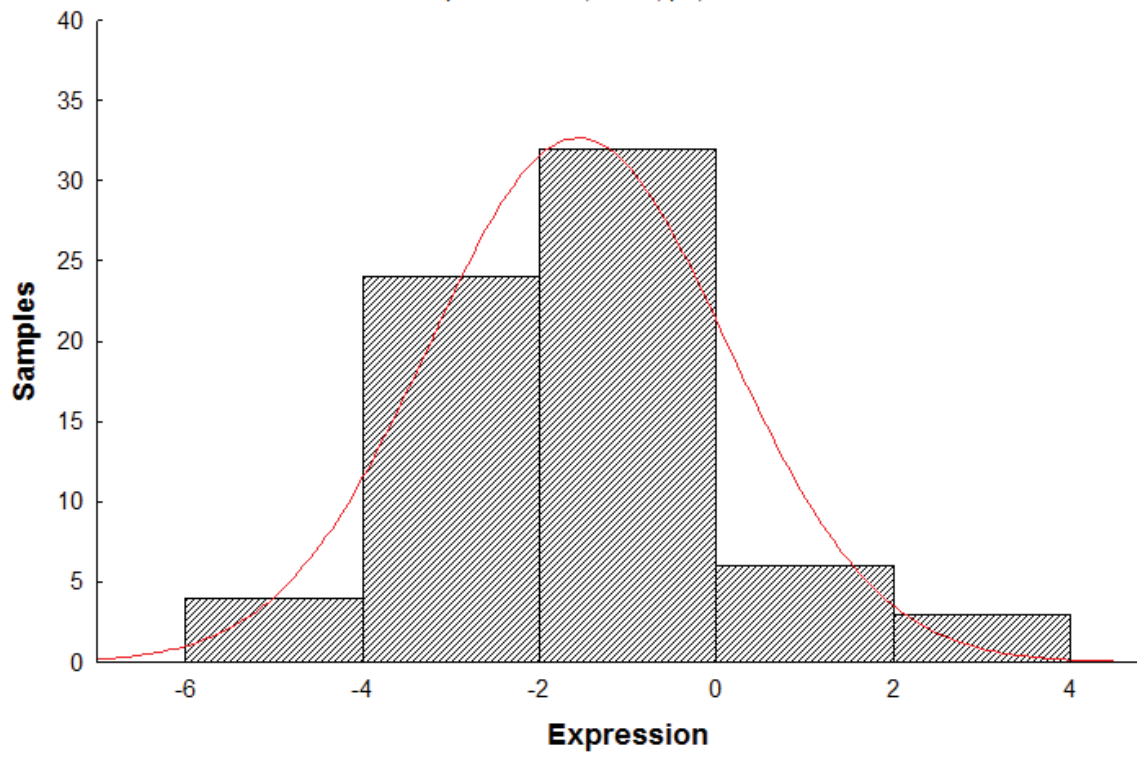
Para ambos os genes foram realizados testes de normalidade afim de identificar o teste mais adequado, e ambos os genes demonstraram uma distribuição normal da curva. As amostras, principalmente para *CDH1*, que influenciavam na média de forma a distorcer a normalidade foram retiradas dos cálculos onde a comparação das médias foi realizada. Abaixo estão demonstrados os gráficos de normalidade para os genes *CDH1* e *VIM*, respectivamente.



Normality test - VIM

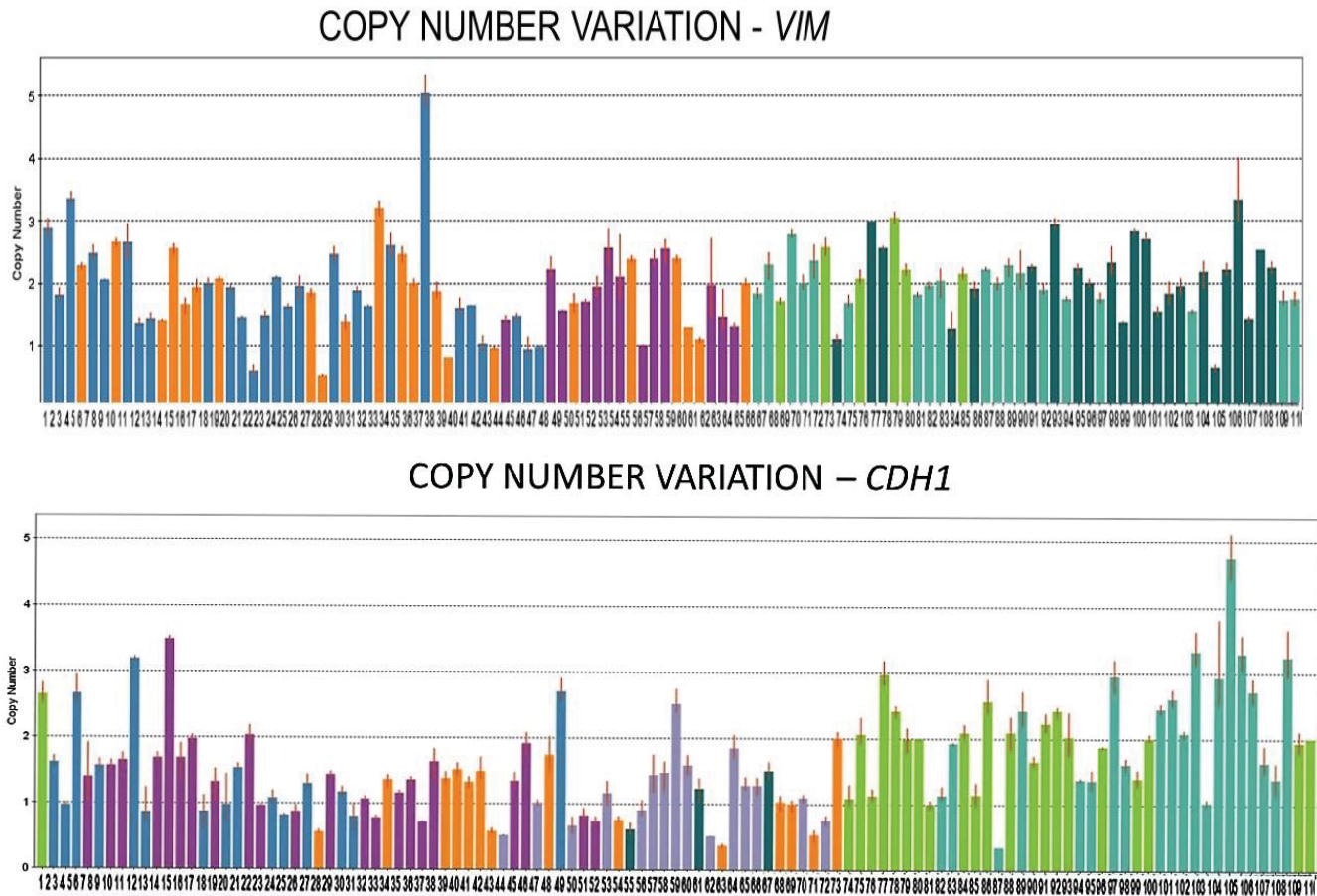
K-S $d=,08857$, $p> .20$; Lilliefors $p> .20$

Shapiro-Wilk $W=,96425$, $p=,04567$



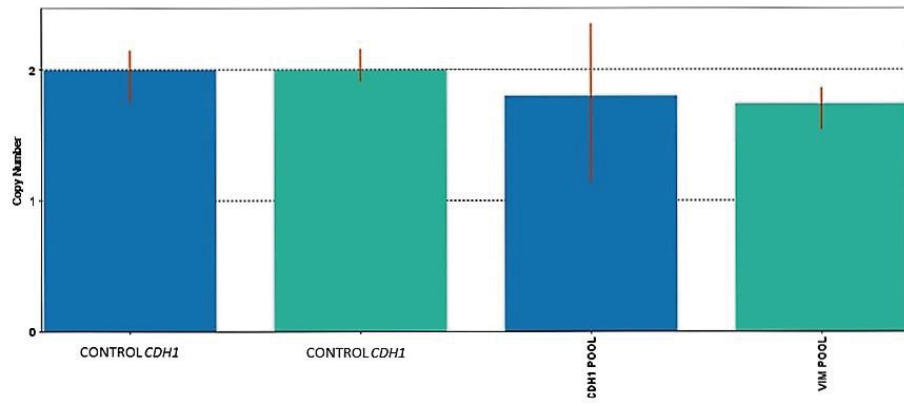
ANEXO IV

RESULTADO TOTAL DAS AMOSTRAS REFERENTES À TÉCNICA DE ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS.



As figuras acima representam a variação do número de cópia dos genes *CDH1* e *VIM* dentro do grupo amostral de 110 pacientes diagnosticadas com câncer de mama. A moda do número de cópias do gene *CDH1* ficou em apenas uma cópia. Já o gene *VIM* apresentou moda 2 para o número de cópias. Os gráficos foram extraídos do *COPYCALLER 2.0™* SOFTWARE (Applied BioSystems). No gráfico abaixo é possível verificar o teste dos controles de experimento mostrando que o *pool* utilizado apresentava 2 cópias para ambos os genes *CDH1* e *VIM*.

Copy Number Variation - controls



ANEXO V

GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS ENTRE OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E IDADE

Os resultados para variação do número de cópias não foram significativos ($P > 0,05$) para diferenciar os subgrupos segundo parâmetros histopatológicos e idade. As figuras abaixo representam a distribuição da variação do número de cópias para ambos os genes *CDH1* e *VIM*, respectivamente.

