

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Natássia Caroline Resende Corrêa**

**Caracterização fenotípica e genômica de  
duas linhagens de câncer de mama  
brasileiras derivadas de tumores primários  
humanos**

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Natássia Caroline Resende Corrêa**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como  
parte dos requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Bioquímica e Imunologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

**Co-orientador:** Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

**2013**

## A Deus,

*Porque os atributos invisíveis de Deus, assim o seu eterno poder, como também a sua própria divindade, claramente se reconhecem, desde o princípio do mundo, sendo percebidos por meio das coisas que foram criadas (...).*

Romanos 1:20

## Agradecimentos

A Deus, que em momentos bons e ruins durante esses 4 anos, me moldou, me fez crescer e certamente me guiou pelo melhor caminho. É por causa Dele que esse trabalho existe e que posso agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma a ele.

Aos meus orientadores, Dawidson e Alfredo, pela orientação tranquila e segura que me proporcionaram. Vocês são os meus exemplos de pesquisadores humanos, preocupados com seus alunos, mais do que em artigos e números. Dawidson, obrigada pela preciosa orientação científica e pelo apoio constante em todas as fases da tese. Alfredo, obrigada por ter me recebido em seu laboratório e por desenhar esse trabalho de forma tão empolgante. Vocês me ensinaram princípios de colaboração e ensino que levarei por toda a vida.

Ao professor Carlos Salas, que me orientou no início do doutorado. Obrigada por ter compreendido meu desejo de aprender coisas novas. A realização dessa pesquisa só foi possível com o seu apoio e, com certeza, foi embasada em inúmeras coisas que aprendi durante o mestrado com você.

À professora Helenice Gobbi pela orientação incrível em patologia e paciência infinita! Obrigada pela contribuição inestimável a esse trabalho e à minha formação.

Às professoras Glória e Carolina pelas importantes sugestões e direcionamentos durante a qualificação.

À professora Sílvia Rogatto pela prontidão em ajudar e orientar e por contribuir de forma relevante a esse trabalho.

Ao Dr. Rafael Rocha (e sua equipe) e Dr. Thiago Souza por suas contribuições valiosas a esse trabalho.

À equipe de sucesso do LICM 1 e 2. Temendo o esquecimento de alguma pessoa, agradeço a todos, pela convivência agradável e alegre e por inúmeros momentos de colaboração e ajuda. Devo agradecer especialmente a três pessoas do LICM 1: Cristiane, Caryne e Betinha. Cris e Caryne, obrigada pelo apoio inicial que recebi, esse trabalho também é de vocês! Betinha, obrigada pelo suporte vital que nos dá no laboratório, além do carinho de mãe e comidas gostosas.

À equipe do LICM 2, não posso deixar de agradecer especialmente às minhas amadas Flohs! Ana Carol, obrigada por se fazer presente e me ajudar a continuar, mesmo quando estava a milhares de quilômetros! Obrigada pelos conselhos que me ajudavam a ver tudo de uma forma mais positiva. Carol Melo, minha linda afilhada...obrigada por me salvar tantas vezes,

de forma emocional, espiritual, física e profissional! Você é luz e ilumina minha vida! Carol Andrade, minha floca Andrade! Quero te agradecer pelo suporte no laboratório, pela amizade e por tantos momentos alegres que me mantiveram mais firme nesses anos. À Floh Gold Jerusa, por todas as células cultivadas, conversas acadêmicas (e também pouco acadêmicas) e idas no melhor sacolão do mundo. Você também ajudou a desenhar e guiar esse projeto, sou muito agradecida a você!

À Raquel... minha Mim! Sem você eu não seria nada em BH. Você sabe a importância que você teve e tem na minha vida, em tantos momentos diferentes que enfrentei. Você foi a minha rocha aí em BH ... Obrigada por ser minha irmã mais velha!!! Graças a seu incentivo incondicional, eu estou aqui hoje.

Ao Samuel e ao Rubens, por tantos momentos de descontração, mesmo quando o mundo parecia estar caindo a nossa volta. Obrigada por estarem lá por mim quando mais precisei!!!

Às queridas Louisa e Irma, pelo companheirismo, pela amizade e pelo incentivo constante em prosseguir. Vocês me ajudaram a superar tantos momentos difíceis! Nunca me esquecerei disso!

À Jankerle, profissional e pessoa espetacular...obrigada por tantos momentos agradáveis em casa.

Quero também agradecer à Ciça. Obrigada por me proporcionar a experiência de te orientar e ensinar. Mas mais que isso, a cobertura espiritual e acolhida em momentos em que só você me entendia!

Ao querido Guilherme, por me permitir participar de seu trabalho e pela excelente amizade que surgiu do fluxo laminar!

Aos amigos da UFMG Paulex, Lili, Brisa, Isabela, Cacai, Ju Barbosa, Jamil, Simara, Mari, Joaquim, Fabio, Marco Tulio, Henrique, Maira, Soninha e Daniel pelos alegres momentos compartilhados.

À Hellen e Francine, pelo apoio e disponibilidade constante, e pela contribuição breve mas importantíssima a esse estudo.

À Iria e ao pessoal do laboratório da professora Gerluza pelo apoio experimental e contribuição a esse trabalho.

Ao Juliano, sempre pronto a me atender no NAGE, obrigada!

Aos colegas do CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear) pela ajuda nos experimentos de irradiação.

Aos professores, técnicos e colegas do Departamento de Bioquímica e Imunologia que, com pequenos gestos e favores, me ajudaram a concluir esse trabalho.

E não menos importante, quero agradecer àqueles que também me mantiveram firme durante o doutorado, mesmo não pertencendo ao meio acadêmico.

Ao meu esposo Guilherme, fonte de força para prosseguir e finalizar o doutorado. Obrigada por compreender a importância desse momento e não me deixar desanimar. Espero poder fazer o mesmo por você em breve!

Aos meus pais (Paulo e Aparecida) e irmãs (Priscilla e Ticiano), por entenderem a importância de estudar e crescer profissionalmente. Vocês foram meu refúgio nos momentos mais difíceis. Obrigada ao meu Ohana, Fabiano, por me apoiar incondicionalmente. Obrigada também à minha madrinha Fátima e à Pupunha, por me manter forte e decidida. Agradeço também ao Leo, Marcos, Telma, Laura, Deivy e tia Márcia, por me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos amigos da Igreja Presbiteriana da Pampulha, em especial ao pastor Giovan, Jaime, Mirka e Ricardo, Graça, Teresa e sua família por me acolherem tão bem e por contribuírem grandemente ao meu crescimento pessoal em BH e, conseqüentemente, a quem sou hoje.

Ao meu maninho Elias, pelos incontáveis conselhos e por influenciar minha vida acadêmica positivamente desde a graduação. Sei que posso contar sempre com você!

À Sabrina, pelas caminhadas e conversas de que tanto sinto saudades.

À equipe de altíssima performance do Laboratório de Plant Analysis da Syngenta. Vocês me ensinam diariamente o poder de uma equipe unida e eficiente, que trabalha no limite sem perder o bom humor. E mais que isso, me mostram todo dia que Biologia Molecular funciona!

Aos meus amigos Amanda, Flaviana, Taís, Flávia, Jr, Diego e Gabriele pela amizade e apoio durante todo o doutorado, mesmo à distancia.

E finalmente, à Fapemig, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

***Questions of science, science and progress, do not speak as loud as my heart.***

The Scientist, ColdPlay

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Pesquisas utilizando linhagens de células de câncer de mama derivadas de tumores primários podem acrescentar dados importantes para o entendimento desse tipo de câncer. O objetivo desse trabalho foi investigar os perfis genômico e fenotípico das células MACL-1 e MGSO-3, duas linhagens de câncer de mama derivadas de tumores primários humanos. A presença de marcadores hormonais, de proliferação, diferenciação e de células-tronco foram avaliados por imuno-histoquímica do tumor primário, em células em cultura e também em tumores derivados de implantes das células em camundongos imunodeficientes. O perfil cromossômico e as alterações em número de cópias genômicas foram investigados por bandeamento G e hibridização comparativa baseada em arranjos. Para avaliar a expressão gênica dessas células foram utilizados microarranjos de cDNA e PCR em tempo real. A análise histopatológica e imuno-histoquímica mostraram que o tumor primário invasivo que deu origem à linhagem MACL-1 é um carcinoma do subtipo luminal A e que o carcinoma ductal *in situ* que deu origem à linhagem MGSO-3 é do subtipo HER2. As linhagens celulares e os implantes em camundongos apresentaram alto potencial proliferativo, mas não mantiveram a expressão dos outros marcadores. A avaliação do perfil genômico mostrou grandes rearranjos cromossômicos e várias alterações no número de cópias dessas células, que apresentaram principalmente perdas genômicas. A análise preliminar dos dados de microarranjo de cDNA mostrou alterações em diferentes vias de sinalização e a PCR em tempo real confirmou a expressão de alguns genes avaliados no microarranjo. Com esses dados, MACL-1 e MGSO-3 se tornam as primeiras linhagens celulares de mama brasileiras derivadas de tumores primários bem caracterizadas, tornando-se potenciais modelos para estudos comparativos com outras linhagens celulares.

**Palavras-chave:** câncer de mama, tumor primário, linhagem celular, MACL-1, MGSO-3, implante de tumor, imuno-histoquímica, bandeamento G, aCGH, microarranjo de cDNA, PCR em tempo real.



## ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. Research using breast cancer cell lines derived from primary tumors could add valuable knowledge about this type of cancer. The aim of this study was to investigate the genomic and phenotypic profiles of MACL-1 and MGSO-3 cell lines, derived from primary human tumors. The presence of hormone receptors, proliferation, differentiation, and stem cell markers were evaluated using immunohistochemistry of the primary tumor, cultured cells, and xenografts implanted in immunodeficient mice. The chromosomic profile and copy number alterations on these cells were investigated by G banding and array comparative genomic hybridization. To assess gene expression profile cDNA microarrays and Real time PCR were used. Histopathological analysis and immunohistochemistry showed that the invasive primary tumor from which MACL-1 cell line was derived was a luminal A subtype carcinoma, and the ductal carcinoma *in situ* that gave rise to MGSO-3 cell line was a HER2 subtype tumor. Cell lines and the xenograft tumors in mice preserved their high proliferative potential, but did not maintain the expression of all other markers investigated. Whole-genome evaluation showed a large amount of chromosome rearrangements and copy number alterations in both cell lines, especially losses. The preliminary analysis of cDNA microarray data exhibits main changes on different cell signaling pathways and Real time PCR analysis confirmed the expression level of some of the genes from the microarray. These findings make MACL-1 and MGSO-3 the first characterized Brazilian breast cancer cell lines, which could be potentially used for comparative research.

**Key words:** breast cancer, primary tumor, cell line, MACL-1, MGSO-3, xenografted tumor, immunohistochemistry, G banding, aCGH, cDNA microarray, Real time PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Perfis imunohistoquímicos de RE, RP, HER2 e Ki-67 das amostras de tumor da Paciente 1 (Paciente 1), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MACL-1 (Implante MACL-1) e das células MACL-1 (Células MACL-1). Barra: 100  $\mu\text{m}$  ..... 38
- Figura 2: Perfis imunohistoquímicos de CD44, CD24, CD133, Ck5 e EGFR das amostras de tumor da Paciente 1 (Paciente 1), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MACL-1 (Implante MACL-1) e das células MACL-1 (Células MACL-1). Barra: 100  $\mu\text{m}$ . ..... 40
- Figura 3: Perfis imunohistoquímicos de RE, RP, HER2 e Ki-67 das amostras de tumor da Paciente 2 (Paciente 2), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MGSO-3 (Implante MGSO-3) e das células MGSO-3 (Células MGSO-3). Barra: 100  $\mu\text{m}$ ..... 41
- Figura 4: Perfis imunohistoquímicos de CD44, CD24, CD133, Ck5 e EGFR das amostras de tumor da Paciente 2 (Paciente 2), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MGSO-3 (Implante MGSO-3) e das células MGSO-3 (Células MGSO-3). Barra: 100  $\mu\text{m}$ . ..... 43
- Figura 5: Metáfases das linhagens de células MACL-1 e MGSO-3 evidenciadas por bandeamento G..... 45
- Figura 6: Metáfases de células MACL-1 evidenciadas por coloração por DAPI. (a) perfil geral da metáfase. (b) as setas vermelhas indicam pontos de alterações estruturais evidentes nos cromossomos.  $2n= 37$  cromossomos. .... 46
- Figura 7: Metáfases de células MGSO-3 evidenciadas por coloração por DAPI. (a) perfil geral da metáfase. (b) as setas vermelhas indicam pontos de alterações estruturais evidentes nos cromossomos.  $2n= 36$  cromossomos. .... 47
- Figura 8: Perfil eletroforético do DNA genômico das células MACL-1 e MGSO-3 após extração por lise com SDS/proteinase K e purificação por fenol-clorofórmio. 100 bp: marcador 100 bp DNA ladder (Life Technologies). Gel de agarose a 0,8%. .... 48
- Figura 9: Perfil de digestão das amostras controle (DNA feminino), MACL-1 e MGSO-3. 100 bp: marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Gel de agarose a 0,8%..... 49
- Figura 10: Representação esquemática das alterações do número de cópias das células MACL-1 (acima) e MGSO-3 (abaixo) utilizando a plataforma de hibridização SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies). Barras vermelhas representam perdas e barras azuis representam ganhos. Barras de tamanho duplo representam alterações detectadas nas replicatas de *dye swap*. .... 50

- Figura 11: Perfil eletroforético dos RNAs extraídos de células de mama normal (PEL, 400 ng), MACL-1 (MA, 1.5 µg), MACL-1 irradiada (MAi, 1.3 µg) e MGSO-3 (MG, 1 µg). P: 100 bp DNA ladder (Fermentas). .....55
- Figura 12: Amplificação do gene *GAPDH* utilizando as amostras de cDNA controle positivo (C+), MACL-1 (MA), MGSO-3 (MG), MACL-1 irradiada (MAi) e células de mama normal (PEL)..... 55
- Figura 13: (A) Eletroferograma gerado pelo programa BioAnalyzer, mostrando o perfil do tamanho dos fragmentos presentes nas amostras de cDNAs utilizadas no microarranjo. As amostras B e U são amostras referência para a avaliação da qualidade da síntese de cDNA. (B) Gráfico de fluorescência *versus* pares de bases mostrando o perfil de distribuição de fragmentos, em função do tamanho (em pares de base). ..... 56
- Figura 14: Figura representativa da interface do “Volcano-plot” da plataforma Matlab, mostrando o gráfico de  $\log_2$  (*fold change*) por  $-\log_{10}$  (p-valor). Ao lado direito, o programa fornece uma tabela dos genes superexpressos (*up-regulated*) e subexpressos (*down-regulated*) e seus p-valores respectivos. .... 57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários, clones, diluições, fabricantes e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados nas reações imuno-histoquímicas.....	20
Tabela 2: Recomendações de interpretação do teste de HER2 propostos pelo Colégio Patologistas Americanos e Sociedade Americana de Oncologia Clínica.....	21
Tabela 3: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>ATF5</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3. ....	32
Tabela 4: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>B4GALT1</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.....	32
Tabela 5: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>CAST</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3. ....	32
Tabela 6: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>LARP1</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3. ....	33
Tabela 7: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>RDH10</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3. ....	33
Tabela 8: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>SFN</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3. ....	33
Tabela 9: <i>Fold-change</i> e p-valor do gene <i>VDR</i> nas linhagens MACL-1 e MGSO-3. ....	33
Tabela 10: Sequência de iniciadores dos genes candidatos aos experimentos de PCR em tempo real.....	34
Tabela 11: Perfil imunohistoquímico dos tumores primários das pacientes (Pacientes 1 e 2), células em cultura (MACL-1 and MGSO-3) e tumores implantados em camundongos Nude derivados das linhagens celulares (Implantes de células).....	37
Tabela 12: Regiões cromossômicas alteradas em MACL-1, presente nas duas replicatas e com p-valor < 0.05. ....	51
Tabela 13: Regiões cromossômicas alteradas em MGSO-3, presente nas duas replicatas e com p-valor < 0.05.....	52
Tabela 14: Exemplos de regiões cromossômicas alteradas nas linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3, presentes em ambas replicatas e com $0p < 0.05$ . ....	54
Tabela 15: Categorias funcionais (processos biológicos) mais representativos nos genes diferencialmente expressos (DE) nas células de linhagem MACL-1. ....	58
Tabela 16: Categorias funcionais (processos biológicos) mais representativos nos genes diferencialmente expressos (DE) nas células de linhagem MGSO-3. ....	59

Tabela 17: Categorias funcionais (processos biológicos) mais representativos nos genes diferencialmente expressos (DE) nas células da linhagem MACL-1, submetida à irradiação em comparação com células da linhagem MACL-1 não-tratadas. ....	60
Tabela 18: Valores aproximados de <i>fold-change</i> observados no microarranjo de cDNA, dos genes das proteínas avaliadas no experimento de imuno-histoquímica, nas células MACL-1. ....	61
Tabela 19: Valores aproximados de <i>fold-change</i> observados no microarranjo de cDNA, dos genes das proteínas avaliadas no experimento de imuno-histoquímica, nas células MGSO-3. ....	61
Tabela 20: Sumário dos dados de <i>fold-change</i> ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) dos genes de interesse. ....	63
Tabela 21: Resultado da análise estatística dos dados de <i>fold-change</i> utilizando One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). O valor negativo (sinal “-”) representa subexpressão do gene em relação à amostra normalizadora. O valor positivo (sinal “+”) representa superexpressão do gene em relação à amostra normalizadora. Quando a amostra não teve diferença estatística em relação à amostra normalizadora, o dado está apresentado como não significativo (N/S). N/A representa uma condição não avaliada. ....	64

**LISTA DE ABREVIATURAS**

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
A260/230	Razão das absorbâncias a 260 nm por 230 nm
A260/280	Razão das absorbâncias a 260 nm por 280 nm
aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i> (hibridação genômica comparativa baseada em arranjos)
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i> (Sociedade Americana de Oncologia Clínica)
bp	<i>Base pair</i> (par de base)
CAP	<i>College of American Pathologists</i> (Colégio Americano de Patologistas)
cDNA	DNA complementar
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (hibridação genômica comparativa)
Ck5	Citoqueratina 5
CMF	Ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil
CNA	<i>Copy number alteration</i> (alteração no número de cópia)
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Co <sup>60</sup>	Cobalto 60
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloro
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> (4',6-diamidino-2-phenilindol)

DE	Diferencialmente expresso
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultura modificado de Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desóxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor de EGF
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (hibridação <i>in situ</i> por fluorescência)
g	Força gravitacional
gDNA	DNA genômico
Gy	Gray
Kbp	<i>Kilobase pair</i> ( $10^3$ pares de base)
M	Molar
Mbp	<i>Megabase pair</i> ( $10^6$ pares de base)
mg	Miligrama
ml	Mililitro
N/A	Não avaliado
N/S	Não significativo
NAGE	Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para Informação em Biotecnologia)
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RE	Receptor de estrógeno
RI	Radiação ionizante
RMA	<i>Robust Multichip Average</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RP	Receptor de progesterona
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SKY	<i>Spectral karyotyping</i> (cariotipagem espectral)
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i> (tampão salino de citrato de sódio)
STC	<i>Sample tracking control</i>
TE	Tampão Tris - EDTA
TNM	T: tamanho do tumor; N: envolvimento de linfonodos axilares; M: presença de metástase
U	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	2
1.1.	Câncer .....	2
1.2.	Câncer de mama .....	4
1.3.	Classificação do câncer de mama .....	6
1.4.	Técnicas moleculares aplicadas à investigação do câncer de mama .....	9
2.	OBJETIVOS .....	14
2.1.	Objetivo geral.....	14
2.2.	Objetivos específicos .....	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1.	Aprovações por Comitês de Ética.....	16
3.2.	Cultura celular.....	16
3.2.1.	Obtenção e cultivo de células normais .....	16
3.2.2.	Manutenção das células tumorais.....	17
3.3.	Irradiação das células.....	17
3.4.	Imuno-histoquímica .....	18
3.4.1.	Preparo das lâminas dos tumores primários.....	18
3.4.2.	Preparo das lâminas dos tumores originados da injeção de células tumorais em camundongos Nude.....	18
3.4.3.	Preparo das lâminas das células em cultura .....	19
3.4.4.	Coloração das lâminas .....	19
3.5.	Estudo citogenético das linhagens MACL-1 e MGSO-3 .....	22
3.6.	Hibridação genômica comparativa baseada em arranjos (aCGH).....	24
3.6.1.	Preparo da lâmina de aCGH .....	24

3.6.2.	Análise dos dados de aCGH .....	26
3.7.	Microarranjos de cDNA.....	27
3.7.1.	Extração de RNA .....	27
3.7.2.	Síntese cDNA fita dupla .....	28
3.7.3.	Microarranjo e análise dos dados .....	30
3.8.	PCR em tempo real .....	31
3.8.1.	Escolha dos genes constitutivo e genes candidatos.....	31
3.8.2.	Reação de PCR em tempo real .....	34
4.	RESULTADOS .....	37
4.1.	Imuno-histoquímica .....	37
4.2.	Estudo citogenético .....	44
4.4.	Microarranjo .....	55
4.5.	Microarranjo <i>versus</i> imuno-histoquímica.....	60
4.6.	PCR em tempo real .....	62
5.	DISCUSSÃO .....	68
6.	CONCLUSÕES.....	79
7.	PERSPECTIVAS .....	81

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer

O câncer é um problema de saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morte no mundo. Em 2008, o câncer foi responsável por 13% dos óbitos no mundo. Estima-se que este índice continue a aumentar e que 13,1 milhões de pessoas irão morrer dessa doença em 2030 (WHO, 2011). No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer 17% dos óbitos registrados em 2007 tiveram como causa o câncer, percentual somente superado pelas doenças cardiovasculares (INCA, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 foram de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Os tipos de câncer mais frequentes no Brasil entre os homens são o de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago, enquanto que nas mulheres são os tumores de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e pulmão (INCA, 2011).

A carcinogênese é um processo multifatorial, envolvendo diversas alterações genéticas que levam à transformação de células normais em células cancerígenas (Hanahan & Weinberg, 2011). O surgimento do câncer também depende da predisposição genética do indivíduo e a fatores secundários como tabagismo, sedentarismo, consumo de bebida alcoólica, exposição excessiva ao sol e principalmente à idade (Stein, Colditz & 2004; INCA, 2009).

Hanahan e Weinberg (2011) sugerem seis alterações principais para que haja transformação celular maligna: resistência à morte celular, indução da angiogênese, potencial replicativo ilimitado, mecanismos de invasão e metástase, evasão de supressores de crescimento e sinal proliferativo sustentável. Essas funções são adquiridas por diferentes tipos de tumores, por mecanismos distintos e em tempos variados durante o curso da tumorigênese e são o resultado de mutações e/ou alterações cromossômicas que podem desencadear instabilidade genômica. Hanahan e Weinberg ressaltam que essa mesma

instabilidade genômica é uma das características que “habilitam” as células tumorais a gerar e acumular mais mutações (Holland & Cleveland, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011). Eles também propõem que o estado inflamatório de lesões pré-malignas e malignas também habilite o desenvolvimento de características tumorais, e que o escape das células ao sistema imune e mudanças do estado energético da célula também influenciam a tumorigênese (Hanahan & Weinberg, 2011).

A observação de que muitas células cancerígenas possuem alterações no número e organização dos cromossomos indica que a instabilidade cromossômica é fator crucial no estabelecimento de muitos tipos de câncer. Essa instabilidade é principalmente causada por falhas nos pontos de checagem do ciclo celular, o que leva a separação defeituosa das cromátides irmãs durante a mitose, causando aneuploidia. As mutações que causam alterações nesses processos podem ocorrer tanto nos genes que codificam as proteínas diretamente responsáveis pela separação das cromátides, bem como nos genes de proteínas responsáveis pela regulação dos pontos de checagem do ciclo celular. Ainda que a instabilidade cromossômica muitas vezes possa comprometer o ciclo celular e ser deletéria à célula, muitas células cancerígenas sobrevivem a esse processo, tornando-se estáveis para propagar novas células defeituosas (Holland & Cleveland, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

Apesar da presença de alterações genéticas constituir uma característica frequente em tumores, o tipo e o grau de diferenciação celular também parecem ser determinantes na agressividade de alguns tipos de câncer, uma vez que tumores classificados inicialmente como de um tipo específico podem apresentar resistência a quimioterápicos, radioterapia e terapias adjuvantes. Essa resistência parece ocorrer devido a um pequeno grupo de células não diferenciadas que dariam origem às células mais diferenciadas da massa tumoral. Atualmente existe uma hipótese que estas células são células-tronco tumorais (Wicha et al., 2006). Por serem mais resistentes à apoptose (Gil *et al.*, 2008), após um tratamento que eliminaria a maior parte das células existentes em um tumor, as células-tronco tumorais poderiam persistir na massa tumoral residual, estabelecendo um novo tumor, ocasionando a recidiva do câncer. Essas células tem sido encontradas em tumores de mama (Al Hajj *et al.*, 2003), cabeça e pescoço (Prince *et al.*, 2007) e pâncreas (Li *et al.*, 2007), entre outros

(Harper *et al.*, 2010) e parecem explicar a resistência de alguns tumores a tratamentos já bem estabelecidos para determinado tipo tumoral.

Dentre os vários tipos de câncer se destaca o câncer de mama, que foi estudado nesse trabalho devido à sua importância e alta incidência no Brasil e no mundo.

## 1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres (WHO, 2006). No Brasil, o câncer de mama é a segunda principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres e estimou-se que em 2012 fossem registrados 52.680 novos casos, cerca de 10% de todos os casos de câncer previstos para esse período no país (INCA, 2011).

Alguns fatores predisponentes para o aparecimento do câncer de mama já são bem estabelecidos como: influências geográficas, predisposição genética, idade avançada, duração da vida reprodutiva, nuliparidade, idade do nascimento do primeiro filho, obesidade e mudanças no epitélio mamário. Além disso, para os cânceres dependentes de hormônios, a exposição prolongada a estrógenos, endógenos ou exógenos, também predispõe o indivíduo ao câncer de mama (Kumar *et al.*, 2010; NCI, 2013a).

A etiologia precisa do câncer de mama é desconhecida, sendo que somente 5-10% desse tipo de câncer é causado por mutações herdadas. O câncer de mama é composto por uma coleção de tipos diferentes de doença, que diferem em sua progressão, resposta a tratamento e sobrevivência (van Beers & Nederlof, 2006; Kumar *et al.*, 2010).

Entre os principais tipos de câncer de mama estão o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo (ou infiltrativo). O carcinoma intraductal *in situ* é o tipo histológico mais comum, correspondendo a 20-30% de todos os tipos de câncer de mama e é definido como uma proliferação celular anormal com predileção pelas unidades ducto-lobulares terminais da mama, associadas a proeminente envolvimento de ductos verdadeiros e alto risco de recorrência local, quando não realizado tratamento adequado. O carcinoma ductal *in situ* é uma lesão heterogênea, sob o ponto de vista histológico, e pode constituir um espectro de

lesões. (Salles *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010). Os pacientes com este tipo de câncer possuem melhor prognóstico.

O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais frequente de câncer de mama, ocorrendo em aproximadamente 65-80% dos casos (Zhao *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010). Histologicamente, o tumor consiste em células malignas dispostas em cordões, ninhos de células sólidos, túbulos, glândulas, massas anastomizadas e uma mistura de todos esses perfis, não apresentando característica morfológica especial. Ele possui um prognóstico pior que o carcinoma ductal não invasivo. Outras formas de câncer de mama menos frequentes são o carcinoma lobular invasivo e não invasivo, carcinoma tubular, cribriforme, mucinoso, papilífero, secretório, apócrino e ainda outras formas raras de câncer de mama (Mallon *et al.*, 2000).

Os tratamentos contra o câncer de mama podem ser divididos principalmente em cirurgia (por exemplo, lumpectomia ou mastectomia radical), fármacos anti-neoplásicos, terapia neo-adjuvante e adjuvante e radioterapia (NCI, 2013b).

Uma vez determinada a necessidade e extensão da ressecção cirúrgica, as pacientes podem ser encaminhadas para tratamento quimioterápico. Entre os quimioterápicos de primeira linha, destacam-se os baseados em antraciclinas, os taxanos e o esquema de tratamento CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil). A maior parte dos agentes quimioterápicos apresenta um efeito adicional ao uso da radioterapia e não distinguem entre as células normais e tumorais (Gerber, 2008).

A radioterapia também é usada no combate ao câncer de mama, sendo associada ou não a outras terapias (NCI, 2013b). A radioterapia baseia-se na exposição da parte do corpo afetada pelo tumor a uma fonte de raios X. Essas radiações são ondas eletromagnéticas de alta energia. Ao interagir com a matéria, induzem ionização dos átomos e moléculas e, por essa razão, são denominadas radiações ionizantes (RI). Ao interagir com células e os tecidos a RI induz a formação de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, danificam, entre outras moléculas, o DNA. Entre as alterações observadas no DNA, podem ser citadas trocas de bases e quebras simples e duplas (Prise *et al.*, 2005; Valerie *et al.*, 2007).

A escolha de cada uma dessas abordagens de tratamento é feita segundo o perfil patológico individual de cada tumor e a histórica clínica e familiar do paciente. Desse modo,

o tratamento do paciente, bem como sua evolução clínica é diretamente dependente das avaliações de diferentes profissionais (mastologista, cirurgião, patologista) que examinam o tumor segundo aspectos anatômicos, morfológicos, bem como a presença de marcadores moleculares. Entretanto, essas análises ainda são insuficientes para definir um tratamento eficaz e novas abordagens precisam ser desenvolvidas.

### **1.3. Classificação do câncer de mama**

O diagnóstico do câncer de mama é realizado através da avaliação de fatores preditivos e prognósticos. Os fatores preditivos são as características clínicas, patológicas e biológicas usadas para estimar a possibilidade de resposta a um tipo particular de terapia adjuvante. Já os fatores prognósticos são as características clínicas, patológicas e biológicas do paciente que permitem prever a evolução clínica, ou seja, a possibilidade de recorrência e sobrevida se o paciente não for tratado (Allred *et al.*, 1998).

Dentre os fatores prognósticos clássicos, ou seja, aqueles já comprovados como indicadores úteis para uso clínico, estão: estadiamento TNM (T = tamanho do tumor, N = envolvimento de linfonodos axilares e M = presença de metástase), tipo histológico, grau histológico, índice proliferativo e invasão angio-linfática (Sobin, Gospodarowicz & Wittekind, 2009). Entretanto esses fatores não são suficientes para a predição da evolução clínica. Desse modo, o consenso de Saint Gallen (Goldhirsch *et al.*, 2009), juntamente com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e Colégio de Patologistas Americanos (CAP) também indicam a avaliação do status dos receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e HER2 para fins prognósticos e indicação de uso de terapia (Wolff *et al.*, 2007; Hammond *et al.*, 2010).

O receptor de estrógeno tem sido usado há décadas como marcador preditivo para câncer de mama, principalmente pela associação positiva entre tumores RE-positivos e o sucesso de tratamento com moduladores seletivos do receptor de estrógeno, como os



inibidores de aromatase e antagonistas do RE. A positividade para esse receptor, juntamente com o RP, é considerada quando a porcentagem de núcleos marcados for maior que 1%.

A imuno-histoquímica identifica o RE como uma proteína nuclear, assim como o RP. A positividade imuno-histoquímica do RP é um marcador de prognóstico favorável e é associado a tumores mais diferenciados e menos invasivos. Muitos estudos mostram que o estímulo da progesterona em associação a seu receptor contribui para a iniciação e desenvolvimento de tumores de mama em camundongos (Obr & Edwards, 2012). Apesar de sua avaliação ser mandatória pela ASCO/CAP, o papel do RP em tumores humanos ainda é discutido (Hammond *et al.*, 2010; Obr & Edwards, 2012). Entretanto, as evidências de que pacientes RE-negativo/RP-positivo possuem maior sobrevida (Bardou *et al.*, 2003) e que respondem à terapia endócrina são suficientes para incluir o RP na avaliação rotineira pelo patologista (Hammond *et al.*, 2010; Obr & Edwards, 2012).

Já a avaliação do marcador do receptor de fator de crescimento epidermal 2, conhecido como HER2, tem-se mostrado de grande valia, já que os pacientes positivos para HER2 podem se beneficiar da terapia direcionada para esse receptor, com os medicamentos trastuzumab e lapatinib (Hudis, 2007). Em 2001, a ASCO/CAP recomendou a avaliação rotineira de HER2 e, em 2007, definiu as diretrizes para avaliação desse receptor pelas técnicas de imunohistoquímica e FISH (*fluorescence in situ hybridization*). A positividade pela imuno-histoquímica é definida como marcação de membrana completa maior que 30%, enquanto que por FISH uma amplificação de seis cópias por núcleo (nos testes sem sonda-controle interna) é considerada positiva (Wolff *et al.*, 2007). Também pela técnica de FISH uma relação de mais de 2.2 entre HER2/CEP17 é considerada positiva (em que CEP17 é uma sonda centromérica do cromossomo 17, cromossomo no qual se localiza o gene de HER2) (Wolff *et al.*, 2007). O HER2 está amplificado em 18-20% dos casos de câncer de mama e esta amplificação está relacionada a um pior prognóstico (Hudis, 2007).

Outros marcadores também têm sido extensamente utilizados na análise patológica e na pesquisa científica, a fim de avaliar a agressividade, ou seja, a capacidade proliferativa e de invasão dos tumores de mama. Para isso, tem-se usado a marcação da proteína Ki-67, que está presente no núcleo e é um indicador que a célula está sofrendo mitose. Dessa forma, utilizando-se esse marcador na imuno-histoquímica, é possível avaliar de maneira

mais precisa o índice mitótico e este tem sido utilizado de maneira rotineira pelos patologistas, apesar de não ter seu uso mandatório determinado pela ASCO/CAP (Yerushalmi *et al.*, 2010).

Outros marcadores para câncer de mama também parecem ter um grande potencial prognóstico e preditivo e, desse modo, têm sido estudados na pesquisa científica, apesar de ainda não terem uso clínico difundido e necessitem de validação por diferentes pesquisadores e em estudos com maior número de indivíduos. Alguns desses marcadores são, por exemplo, aqueles que avaliam o nível de citoqueratinas em tumores de mama, especialmente as citoqueratinas basais 5 e 6 (Ck5/6) que indicam tumores menos diferenciados e mais agressivos (Perou *et al.*, 2000; Gusterson *et al.*, 2005). Além disso, a marcação forte para CD44 e uma marcação fraca ou inexistente para CD24, duas proteínas de superfície encontradas em linhagens linfocitárias, tem sido utilizadas para identificar células-tronco tumorais nos carcinomas de mama (Al Hajj *et al.*, 2003)

Entretanto a marcação CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> não parece identificar células-tronco tumorais em todos os tipos de câncer de mama e outros marcadores tem sido estudados para identificar essas células, como ADLH1 e CD133 (Ginestier *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2008). Receptores ligados a fatores de crescimento como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e outros marcadores de proliferação também têm crescido em importância como fatores preditivos e possíveis alvos terapêuticos (Nielsen *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2010; Foley *et al.*, 2010).

Ainda que o nível de expressão protéica de alguns marcadores forneça à equipe médica maior capacidade de predição da evolução clínica e opções adequadas de tratamento ao paciente, a heterogeneidade particular de cada tumor ainda é um desafio. Pacientes com tumores com características clínicas e patológicas semelhantes mostram diferentes evoluções clínicas, sugerindo a existência de uma regulação adicional e mais complexa na determinação do comportamento do tumor. Assim novas estratégias devem ser desenvolvidas.

#### 1.4. Técnicas moleculares aplicadas à investigação do câncer de mama

A avaliação do perfil gênico característico do câncer de mama e a transcrição desses genes tem sido alvo de muitos estudos, em busca de similaridades entre tumores que, pela análise anatomopatológica são iguais, mas que respondem e evoluem de forma diferente, dificultando a determinação do tratamento mais adequado, risco de recorrência ou recidiva para cada paciente. Desse modo, tem-se buscado novos marcadores capazes de prever melhor o comportamento de um tumor frente a diferentes tratamentos e situações clínicas e essa busca tem sido feita principalmente pela análise genômica e da expressão gênica.

A primeira frente de pesquisa investiga diretamente o genoma das células cancerosas utilizando técnicas como a hibridação genômica comparativa baseada em arranjos (aCGH). Essa técnica, considerada uma evolução dos métodos de cariotipagem por bandeamento G e CGH, foi especialmente desenvolvida para identificar modificações genéticas críticas para a adaptação tumoral, permitindo uma análise global da alteração do número de cópias genômicas (Tan & Reis-Filho, 2008). Recentemente, os estudos de aCGH tem sido utilizados em diferentes perspectivas como identificação de subgrupos de tumores de mama, identificação de genes relacionados a adaptação tumoral, metástase e resposta a tratamentos, identificação de oncogenes (em ampliações genéticas) ou genes supressores de tumor (em deleções) e classificação de cânceres hereditários (van Beers & Nederlof, 2006).

Como exemplos da aplicação de aCGH em câncer de mama tem-se os estudos de Callagy e colaboradores, que identificaram alterações no número de cópias de três genes (*TOP2A*, *ERBB2* e *EMS1*) e relacionaram essas alterações a diferentes prognósticos (Callagy *et al.*, 2005). O trabalho de Loo e colaboradores diferenciou carcinomas ductais infiltrativos (RE positivo ou negativo) e carcinomas lobulares infiltrativos (RE positivo) através da atribuição de alterações de número de cópias genômicas de algumas regiões a esses subtipos (Loo *et al.*, 2004). Além disso, 51 linhagens celulares de câncer de mama tiveram seu genoma caracterizado por aCGH (Neve *et al.*, 2006) e estudos do grupo de Bergamaschi e colaboradores relacionaram perfis de aCGH aos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama (Bergamaschi *et al.*, 2006).

Esses subtipos moleculares haviam sido caracterizados pioneiramente por Perou e colaboradores (2000) e Sorlie e colaboradores (Sorlie *et al.*, 2001), que demonstraram que os cânceres de mama podem ser classificados de acordo com seu perfil de expressão gênica, utilizando microarranjos de cDNA de diferentes tipos de tumores. A clusterização hierárquica dos dados gerados por esses estudos permitiu aos pesquisadores classificarem os diferentes tumores nos subtipos: luminal A, luminal B, HER2, basal e *claudin-low*. O perfil luminal A apresenta a expressão de RE e RP, mas não de HER2 e com baixo perfil proliferativo, enquanto que o subtipo luminal B apresenta RE e RP positivos, podendo apresentar alto ou baixo grau proliferativo e ausência ou presença de HER2, sendo mais agressivo em comparação ao luminal A. O perfil HER2 apresenta RE e RP negativos, e HER2 positivo, enquanto que o subtipo basal não apresenta marcação para RE, RP nem HER2 (triplo-negativo) possuindo superexpressão de outras moléculas como EGFR e/ou Ck5/6 e claudina. Já o subtipo *claudin-low* apresenta características semelhantes ao basal, e possui baixa expressão de proteínas de adesão célula-célula (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2004; Reis-Filho *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2009; Prat *et al.*, 2012).

A importância desse tipo de análise é refletida pela existência de testes genéticos para tumores de mama, disponíveis nos Estados Unidos e na Europa. Um deles, o teste Oncotype DX, permite a avaliação de 21 genes de tumores de pacientes linfonodo-negativo, RE positivo, com perfil invasivo ou em mulheres pós-menopausa, linfonodo-positivo, RE positivo e com câncer invasivo (Sparano & Paik, 2008). Já o teste MammaPrint avalia 70 genes de tumores de estágio inicial, indicando possível recorrência depois da cirurgia, independente do status de RE ou tratamento anterior (Slodkowska & Ross, 2009). Apesar de bastante atraentes, esses testes são altamente controversos, principalmente por se limitarem a perfis específicos de pacientes e não possuírem validação satisfatória (Reis-Filho *et al.*, 2006; Weigelt & Reis-Filho, 2010). Desse modo, a busca por marcadores mais adequados, que abranjam diferentes tipos de pacientes e tumores, bem como uma validação em larga escala ainda são necessários (Reis-Filho *et al.*, 2006; Andre *et al.*, 2011).

As técnicas de biologia molecular que exploram o genoma e os genes diferencialmente expressos em linhagens de câncer de mama podem elucidar quais genes são importantes em diferentes aspectos desse tipo de tumor. Muitos desses estudos

utilizam linhagens celulares de câncer de mama derivadas de metástases, especialmente de aspirados de efusões pleurais (Burdall *et al.*, 2003). Isso significa que a maioria dessas linhagens são derivadas de tumores mais agressivos que já atravessaram vários pontos importantes durante a adaptação tumoral, como aquisição de capacidade invasiva, adesão celular a novos sítios do organismo e adaptação a um novo ambiente tecidual. Essa situação pode sub-representar os diferentes tipos de tumores e tipos celulares, em seus diferentes estágios de adaptação tumoral e direcionar os resultados para apresentar características que são mais representativas de um estado de progressão mais avançado da doença.

Desse modo, a análise do perfil genético, bem como a expressão diferenciada de proteínas em tumores em estágios iniciais pode aumentar o conhecimento científico sobre a adaptação tumoral, permitindo o estudo de novos alvos prognósticos e terapêuticos para esses tipos de tumores (Sidransky, 2002).

Para entender melhor o câncer de mama em seus estágios iniciais nosso grupo de pesquisa tem investigado duas linhagens de câncer de mama derivadas de tumores primários humanos, MACL-1 and MGSO-3. Corrêa e colaboradores caracterizaram essas células como linhagens celulares autênticas uma vez que elas apresentam imortalização através de várias passagens seriadas, expressão de telomerase, perda da inibição por contato e capacidade de formar colônias em placas de ágar e formação de tumores sólidos em camundongos imunodeficientes (Correa *et al.*, 2009). Além disso, essas células apresentam expressão diferencial de *MUC1* e localização de GAPDH na membrana plasmática (Correa *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2010). Bertollo e colaboradores também demonstraram que essas células apresentam resistência à radiação ionizante (Bertollo *et al.*, 2010) e que as caspases 3, 8 e 9 estão envolvidas na morte celular causada pela radiação (Bertollo *et al.*, 2010).

Desse modo, o presente estudo pretende comparar o perfil das células em cultura com as características imuno-histoquímicas presentes no tumor primário e em tumores originados dessas células injetadas em camundongos imunodeficientes. Para avaliar o genoma dessas células, as técnicas de cariotipagem por bandeamento G e aCGH identificam quais modificações estruturais cromossômicas essas células possuem. Além disso, esse trabalho avalia a expressão gênica diferencial das células MACL-1 e MGSO-3 em relação a controles de mama normal, bem como o perfil de expressão gênica da célula MACL-1 com

sua contraparte irradiada, através de microarranjos de cDNA e PCR em tempo real. Esses resultados possibilitarão uma caracterização aprofundada das linhagens MACL-1 e MGSO-3, mapeando as alterações genômicas e fenotípicas dessas células, permitindo que elas sejam usadas em estudos comparativos com outras linhagens celulares e tumores sólidos.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar o perfil genômico e fenotípico das linhagens de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Investigar a presença de marcadores protéicos nas células MACL-1 e MGSO-3, em comparação com os tumores primários que deram origem a essas linhagens e implantes de tumor derivados das células em cultura em camundongos imunodeficientes, utilizando a técnica de imuno-histoquímica;
- Avaliar as alterações estruturais e numéricas dos cromossomos de MACL-1 e MGSO-3 por cariotipagem por bandeamento G;
- Analisar o número de alterações de cópias genômicas presentes nessas células através de aCGH;
- Identificar os genes diferencialmente expressos nas células de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3, tratadas ou não com radiação ionizante, comparando com células de mama normal, utilizando microarranjos de cDNA;
- Validar genes candidatos dos microarranjos através de PCR em Tempo Real.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aprovações por Comitês de Ética**

O procedimento de obtenção e cultivo de células normais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob número ETIC 0312 0203 000 10 (Anexo 1).

O procedimento de obtenção e cultivo de células tumorais em camundongos Nude foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob número 035/11 (ver Anexo 1).

#### **3.2. Cultura celular**

##### **3.2.1. Obtenção e cultivo de células normais**

As células de mama normais foram obtidas de fragmentos da mama de pacientes internadas na Clínica de Cirurgia Plástica, do Núcleo de Cirurgia Plástica, coordenada pelo Dr. Luiz Lamana dos Santos, localizada em Belo Horizonte, Minas Gerais. As células foram isoladas segundo protocolo adaptado de Speirs e colaboradores (Speirs *et al.*, 1996). De forma resumida, o fragmento de mama foi limpo para retirada de tecido adiposo com ajuda de tesouras e pinças. Em seguida, a parte parenquimatosa da mama foi cortada em fragmentos de cerca de 1 mm e incubadas em colagenase IV 0,25% (Life Technologies), em estufa úmida com 5% CO<sub>2</sub>, à 37 °C, *overnight*. Os fragmentos restantes após a dissolução do material foram filtrados em gaze estéril e o filtrado foi centrifugado a 15, 104 e 252 x g para melhor separação de gordura remanescente. Os pellets derivados dessas centrifugações, bem como o sobrenadante da última centrifugação foram mantidos em frascos de cultura celular T-25 (Sarstedt) contendo meio de cultura modificado de Dulbecco (DMEM – Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia Ltda) e com os antibióticos gentamicina (50 mg/L) e solução antibiótica/antimicótica (10.000 U penicilina/ml; 10 mg estreptomicina/ml; 25 ug anfotericina B/ml, Sigma-Aldrich) diluída 100 vezes. As culturas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, à 37 °C e mantidas na garrafa T-25 (Sarstedt) até que atingisse cerca de 70% de confluência, quando

foram transferidas para frascos T-75 (Sarstedt). Para os experimentos, foram utilizadas células até a quinta passagem.

### **3.2.2. Manutenção das células tumorais**

As linhagens MACL-1 e MGSO-3 utilizadas nesse trabalho foram estabelecidas por Corrêa e colaboradores (2009) a partir de amostras de tumores primários de pacientes com câncer de mama da Santa Casa de Misericórdia, em Belo Horizonte. As células foram mantidas em frascos de cultura celular T-25 ou T-75 (TPP, Techno Plastic Products ou Sarstedt) contendo meio de cultura DMEM (Life Technologies), suplementado com 10% de SFB (Cripion Biotecnologia Ltda.) e com os antibióticos gentamicina (50 mg/L) e solução antibiótica/antimicótica (10.000 U penicilina/ml; 10 mg estreptomicina/ml; 25 ug anfotericina B/ml, Sigma-Aldrich) diluída 100 vezes. As culturas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, à 37 °C e tripsinizadas a cada dois ou três dias.

Para a extração de RNA e irradiação, as células foram lavadas com PBS 1X (4 g de NaCl, 0,1 g de KCL, 1,08 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustar pH para 7,2 e completar para 500 ml de água) e desprendidas da garrafa incubando-se com tripsina-EDTA 0.05% (Life Technologies), durante 5 minutos à 37 °C. A tripsina foi inativada com DMEM suplementado com 10% SFB. As células foram centrifugadas, o pellet ressuscendido e a contagem de células foi feita em câmara de Neubauer.

As células foram inoculadas em meio de cultura na densidade de, no mínimo, 1 x 10<sup>6</sup> células por garrafa e mantidas até a realização do experimento.

### **3.3. Irradiação das células**

O tratamento das células com radiação gama na dose de 20 Grays (Gy) foi realizado com uma fonte de <sup>60</sup>Co, no Laboratório de Irradiação Gama do CDTN/CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear) de Belo Horizonte, Minas Gerais. As células foram transportadas em garrafas de cultura vedadas e recolocadas em estufa úmida, contendo 5%

de CO<sub>2</sub> à 37 °C, imediatamente após o tratamento. Após 6 horas o RNA das células aderentes foi extraído.

### **3.4. Imuno-histoquímica**

#### **3.4.1. Preparo das lâminas dos tumores primários**

Os tumores primários utilizados nesse estudo foram extraídos de pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

Blocos de parafina contendo os tumores foram confeccionados e cortes de 4 µm foram montados em lâminas com carga elétrica. Análises histopatológicas foram realizadas para cada tumor no Centro de Diagnóstico e Tratamento da Santa Casa de Belo Horizonte-MG (ver laudos no Anexo 2), confirmando a natureza tumoral maligna desses fragmentos.

O tumor da paciente 1 foi caracterizado como carcinoma ductal invasor de mama, com atipias nucleares moderadas, algumas mitoses e pouca formação de túbulos (grau II de Bloom-Richardson), com desmoplasia moderada, escasso infiltrado linfóide e frequentes microcalcificações.

O tumor da paciente 2 foi caracterizado como carcinoma intraductal de alto grau, com focos de necrose central, tipo comedocarcinoma, sem áreas de invasão franca do estroma.

#### **3.4.2. Preparo das lâminas dos tumores originados da injeção de células tumorais em camundongos Nude**

Camundongos fêmeas BALB/c.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/AnNTacUnib, de 6 a 8 semanas, foram obtidas do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratório) da Unicamp (Campinas, SP) e mantidas em gaiolas autoclavadas, contendo ração e água estéreis.

Cerca de  $1 \times 10^7$  de células das linhagens MACL-1 e MGSO-3, diluídas em PBS, foram injetadas no dorso de três camundongos, por linhagem celular. O crescimento dos tumores foi acompanhado a cada 3 dias. Uma vez atingido o tamanho de aproximadamente 1 cm (entre 2 e 3 semanas), os camundongos foram sacrificados e os tumores foram excisados e imediatamente fixados em formalina tamponada (100 ml de formol 37 a 40%, 4 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 6,5 g de fosfato de sódio dibásico anidro, ajustar pH para 7, completar para 1 litro com água) durante 24-48 horas, procedendo-se para a inclusão em parafina e confecção das lâminas para imuno-histoquímica.

#### **3.4.3. Preparo das lâminas das células em cultura**

Células das linhagens MACL-1 e MGSO-3, mantidas em DMEM com 10% SFB, foram tripsinizadas e  $1 \times 10^5$  células plaqueadas em *chamber slides* (Lab-Tek II, Nunc). Uma vez atingida a confluência de cerca de 80%, as células foram fixadas em formalina tamponada por 1-2 minutos, e em seguida, lavadas com PBS 1X, pH 7.4 até retirar todo resíduo de formalina. Cada poço da *chamber slide* foi utilizado para marcação com um tipo de anticorpo.

#### **3.4.4. Coloração das lâminas**

A coloração das lâminas foi realizada em colaboração com o Laboratório de Patologia Mamária da UFMG, sob coordenação da professora Dra. Helenice Gobbi e em parceria com o Departamento de Anatomia Patológica, do Hospital A. C. Camargo, sob coordenação do Dr. Fernando Soares, em colaboração com o Dr. Rafael Malagoli Rocha.

Os cortes foram desparafinizados em xilol e álcool, reidratados (com exceção das lâminas de células em cultura) e, então incubados por 20 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio, em metanol absoluto, para o bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se a panela de pressão, em solução tampão citrato 10 mM, pH 6.0, durante 25 minutos a 98 °C. Após resfriamento, os cortes foram lavados por 3 vezes em tampão PBS 0.01 M, pH 7.4. Em

seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, em título e tempo pré-estabelecido conforme a Tabela 1, diluídos em diluente comercial. Após essa etapa, os cortes foram lavados por 3 vezes em tampão PBS 0.01 M, pH 7.4. Foi realizada, então, a incubação com o sistema de polímeros não-biotinilados MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection (Biocare Medical), incubando-se a sonda do kit por 20 minutos, lavando as lâminas 2 vezes em PBS, por 5 minutos e aplicando o polímero (MACH 4MR HRP Polymer) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, por 3 vezes, em banhos de 5 minutos e a revelação foi feita utilizando o cromógeno do kit por 5 minutos ou com uma solução de DAB (3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloroeto, Dako) por 1 minuto.

Alternativamente, após marcação com anticorpo primário, utilizou-se o kit Advance HRP (Dako), incubando o HRP Link por 30 minutos, à 37 °C e, em seguida, lavando com PBS com 3 trocas de 3 minutos. Numa segunda etapa, foi realizada a incubação com Advance HRP Enzyme por 30 minutos à 37 °C, lavando novamente com PBS, com 3 trocas de 3 minutos. A revelação foi feita incubando-se as lâminas em solução de DAB (Dako), incubando por 5 minutos à 37 °C, ao abrigo da luz. A reação foi verificada ao microscópio e parada lavando-se em água corrente, seguida de água destilada. A seguir, foi feita a contracoloração com hematoxilina de Harris (15-30 segundos). As lâminas passaram pela bateria de álcoois e xilóis e foram montadas com meio de montagem Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific) ou alternativamente com Entellan (Merck). As lâminas foram observadas em microscópio de luz, utilizando-se as lentes de 2, 4, 10 e 40 vezes.

Tabela 1: Anticorpos primários, clones, diluições, fabricantes e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Tempo de incubação</b>
Receptor de estrógeno (RE)*	6F11	1:100	Neomarkers	20'
Receptor de progesterona (RP)*	PgR 312	1:200	Novocastra	20'
HER2*	CB11	1:200	Novocastra	30'
Receptor de estrógeno (RE)	SP1	1:100	Neomarkers	30'
Receptor de progesterona (RP)	PgR 636	1:400	Dako	30'

HER2	Policlonal (coelho)	1:200	Dako	30'
		0		
Ki-67	MIB-1	1:800	Dako	30'
CD44 (HCAM)	F10-44-2	1:40	Novocastra	30'
CD24	SN3	1:50	Neomarkers	30'
CD133/ESA	Policlonal (coelho)	1:100	Abcam	30'
Ck5 (Citoqueratina 5)	XM26	1:300	Neomarkers	30'
EGFR	EGFR-25	1:100	Novocastra	30'

\*Anticorpos usados no Laboratório de Patologia Mamária da UFMG. Demais anticorpos utilizados pelo Departamento de Anatomia Patológica, do Hospital A. C. Camargo.

Na avaliação dos receptores de estrógeno e progesterona foi empregado o sistema de escore de Allred. Foram considerados positivos os casos em que mais de 1% das células neoplásicas evidenciaram coloração nuclear moderada ou forte, conforme recomendação do consenso do Colégio Patologistas Americanos e a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (Goldhirsch *et al.*, 2009; Hammond *et al.*, 2010).

A análise da superexpressão da proteína HER2 foi realizada de acordo com as recomendações para interpretação do teste de HER2 proposto pelo Colégio de Patologistas Americanos e Sociedade Americana de Oncologia Clínica (Wolff *et al.*, 2007), como descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Recomendações de interpretação do teste de HER2 propostos pelo Colégio Patologistas Americanos e Sociedade Americana de Oncologia Clínica.

<b>Grau de interpretação</b>	<b>Achado microscópico</b>
0 = negativo	Nenhuma coloração identificada na membrana citoplasmática
1+ = negativo	Coloração de membrana fraca e incompleta em qualquer proporção de células neoplásicas
2+ = indeterminado	Coloração fraca, mas bem definida, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática, em mais de 10% e menos de 30% das células neoplásicas

3+ = positivo                      Coloração forte envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em pelo menos 30% das células neoplásicas

---

Para classificação com anticorpo Ki-67, considerou-se como tumor de alto grau aquele com mais de 15% de marcação das células por Ki-67 e de baixo grau com menos de 14% de marcação, segundo recomendações do Colégio de Patologistas Americanos e Sociedade Americana de Oncologia Clínica (Goldhirsch *et al.*, 2011).

Para os demais anticorpos a presença de reação foi avaliada de maneira qualitativa, uma vez que para esses anticorpos não existem diretrizes bem estabelecidas de positividade/negatividade.

### **3.5. Estudo citogenético das linhagens MACL-1 e MGSO-3**

Uma das técnicas utilizadas para avaliação do perfil cromossômico foi o bandeamento G. O procedimento foi realizado pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD). Para obtenção das lâminas foi utilizada a técnica de espalhamento de metáfase como descrito por Bayani e Squire (2004).

De forma alternativa, outra cariotipagem foi realizada no Laboratório NeoGene do Hospital A.C. Camargo. As células utilizadas nessa cariotipagem são as mesmas utilizadas nos experimentos de aCGH.

Ao meio de cultura de MACL-1 e MGSO-3 foram adicionados 100 µL de colchicina a 0,01 mg/ml e as células foram incubadas à 37 °C por 3 horas. Elas foram então tripsinizadas normalmente, centrifugadas a 125 x g, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com PBS 1X. Em seguida, adicionou-se 5 ml de solução hipotônica (1,12 g de KCl em 200 ml de água), divulsionando ao mesmo tempo e incubou-se as células durante 10 minutos à 37 °C. Em seguida adicionou-se 1 ml de solução fixadora (3 metanol: 2 ácido acético) e incubou-se durante 10 minutos à 37 °C, repetindo essa etapa 1 vez. Centrifugou-se as células por 10 minutos a 125 x g, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se mais 5 ml de solução fixadora, divulsionando constantemente. As células foram então incubadas por 10 minutos à



37 °C e centrifugadas por 10 minutos a 125 x g. Por fim, retirou-se o sobrenadante, deixando um pouco de solução fixadora.

Para montagem da lâmina, divulsionou-se as células e 2 gotas de 50 µl de células foram pingadas de uma altura de 1 metro em uma lâmina molhada em água Milli-Q gelada. A lâmina foi deixada secar ao ar livre e retirou-se o excesso de água com lenços finos, tirando pelas extremidades. Em seguida, as metáfases foram observadas no microscópio invertido, marcando o local onde se encontrava o maior número de metáfases bem espalhadas.

Para marcação com DAPI as lâminas foram mergulhadas em três séries de etanol: três minutos no álcool 70%, três minutos no álcool 90% e três minutos no álcool 100%. Deixou-se secar as lâminas em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de pepsina a 10%, à 37 °C, de 8 a 10 minutos e, posteriormente, em solução 2X SSC a 37 °C, por 10 minutos (solução estoque de SSC 20X: 347 g de NaCl, 174,4g de citrato de sódio, completar para 1 litro de água Milli Q). Novamente mergulharam-se as lâminas em três séries de etanol como anteriormente e as lâminas foram deixadas ao ar livre para secar. Rapidamente se pincelou as lâminas em solução de formamida deionizada (16 ml de solução 10X SSC, 10 mL de água Milli Q, 54 ml de formamida) à 71 °C. Repetiram-se os banhos em álcoois e as lâminas foram finalmente secas ao ar livre.

Novamente se procurou as metáfases nos pontos marcados na etapa anterior e aplicou-se 8 µl de DAPI na lâmina, colocando-se uma lamínula em cima. As metáfases marcadas foram observadas no microscópio de fluorescência Olympus AX61 (Olympus Optical) equipado com câmera CCD (Photometrics CH 250) e as imagens registradas com o auxílio do software CGH View 3.0 (Applied Spectral Imaging Inc.). As imagens foram analisadas pela MSc. Hellen Kuasne e pela Prof. Dra. Silvia Rogatto, ambas do Laboratório NeoGene do Hospital A. C. Camargo.

### 3.6. Hibridação genômica comparativa baseada em arranjos (aCGH)

#### 3.6.1. Preparo da lâmina de aCGH

Os perfis de variação no número de cópias de genes das linhagens MACL-1 e MGSO-3 foram avaliados pela metodologia de hibridação genômica comparativa baseada em arranjos (*array comparative genomic hybridization* – aCGH). Para isso utilizou-se a plataforma SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies) que contém aproximadamente 170.000 sondas de 60 pares de base. Essas sondas mapeiam sequências codificadoras e não-codificadoras presentes no banco de dados genômicos UCSC Hg18 (NCBI Build 36, March 2006).

Para obtenção do DNA genômico (gDNA), cerca de  $2 \times 10^7$  células foram submetidas à lise por SDS/proteinase K e extração por fenol-clorofórmio. As células foram tripsinizadas, centrifugadas, retirou-se o sobrenadante e estas foram lisadas com 500 µl de solução de lise (1,2 g de Tris base, 3,7 g de EDTA, 2,9 g de NaCl, 2,0 g de SDS; ajustar o pH para 8, completar para 1 litro com água Milli-Q) e 20 µl de proteinase K (20 mg/mL). Desmembrou-se o pellet e incubou-se *overnight* à 37 °C. No dia seguinte, adicionou-se 500 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico à solução, agitou-se por inversão seguido por centrifugação por 30 minutos a 13400 x g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 1 µl de RNase A (5 µg/ul) e incubou-se durante 30 minutos à 37 °C. Novamente foi adicionado 500 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, misturou-se por inversão e a solução foi centrifugada durante 30 minutos a 13400 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentou-se 500 µl de clorofórmio, misturou-se por inversão e centrifugou-se durante 10 minutos a 13400 x g. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 1 ml de álcool etílico gelado, 30 µl de acetato de amônio 3M e a solução foi incubada *overnight* à -20 °C, centrifugando-se em seguida por 30 minutos a 13400 x g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, lavou-se o pellet duas vezes com álcool 70% e o pellet foi deixado secar à temperatura ambiente. Uma vez seco, o pellet foi ressuspendido em 30 a 50 µl de água DNase-free.

A avaliação da concentração e qualidade do DNA foi feita utilizando o sistema Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Após quantificação, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 100 ng/ $\mu$ L e a integridade do gDNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% aplicando-se 500 ng de amostra. Como amostra referência foi usado gDNA comercial feminino normal (Promega).

Em seguida, procedeu-se para os procedimentos de digestão, marcação e hibridação. As amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,2  $\mu$ L de água DNase-free, 2,6  $\mu$ L de tampão de reação 10X e 0,5  $\mu$ L das enzimas AluI e RsaI 10U/ $\mu$ L (Promega). A reação foi incubada à 37 °C por 2 horas e as enzimas foram inativadas à 65 °C por 15 minutos. A extensão da digestão foi observada em gel de agarose 0,8% e, quando necessário, o tempo de digestão foi otimizado para digestão ideal do gDNA.

Após digestão, os DNAs teste (MACL-1 e MGSO-3) e referência foram marcados utilizando o kit Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Stratagene, Agilent Technologies). Os experimentos foram realizados em duplicatas em *dye swap* (inversão de sondas), a fim de se verificar a reprodutibilidade do experimento e eliminar artefatos devido ao efeito da marcação com as cianinas. Dessa forma, para uma replicata, a amostra teste foi marcada com Cy3 e a amostra referência foi marcada com Cy5. Na outra replicata a amostra teste foi marcada com Cy5 e a amostra referência marcada com Cy3. Essa reação utilizou iniciadores randômicos e a enzima Exo-Klenow (Agilent Technologies) e foi realizada à 37 °C por 2 horas, seguida de inativação da enzima à 65 °C por 10 minutos.

Com o intuito de remover as cianinas não incorporadas ao gDNA foi realizada a purificação das amostras utilizando-se mini-colunas de celulose Microcon YM-30 (Millipore). Para isso, acrescentou-se 430  $\mu$ L de TE 1X à reação e, em seguida, a mistura foi colocada no tubo Microcon e centrifugou-se por 10 minutos a 8000 x g. Descartou-se o conteúdo do tubo coletor e adicionou-se mais 480  $\mu$ L de TE, centrifugando-se novamente por 15 minutos a 8000 x g, descartando-se mais uma vez o conteúdo do tubo coletor. Dessa vez, a coluna foi alocada num novo tubo, porém com a coluna ao contrário, centrifugou-se por 45 segundos a 8000 x g. Ao líquido resultante da centrifugação acrescentou-se TE para completar para 21  $\mu$ L, caso necessário.

Após a purificação, os gDNAs marcados foram quantificados em Nanodrop ND-1000 Spectrophometer com o objetivo de calcular a eficiência da reação de marcação. Amostras teste e de referência foram avaliados quanto a eficiência (Cy3: 25-40 pmol/ $\mu$ L; Cy5: 20-35 pmol/ $\mu$ L) e combinados na razão de 1:1, segundo recomendação do protocolo da Agilent Technologies.

Em seguida, as amostras foram precipitadas com 19,5  $\mu$ L de acetato de amônio 3M, 300  $\mu$ L de etanol 100% gelado e 5  $\mu$ L de Human Cot a 11 mg/mL (Life Technologies). As amostras permaneceram entre 10-20 minutos à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , seguido de centrifugação a 13400 x g por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado, seguidos de homogeneização por inversão e centrifugação a 13400 x g por 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a retirada do sobrenadante, as amostras marcadas permaneceram à  $37^{\circ}\text{C}$  por alguns minutos para secagem do sedimento sendo adicionados 44  $\mu$ L de TE. O material foi mantido em banho-maria à  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para completa eluição do sedimento.

O procedimento de hibridação consistiu na adição de 11  $\mu$ L de 10X *Blocking Agent* (Agilent Technologies) e 55  $\mu$ L de *Hi-RPM Hybridization Buffer* (Agilent Technologies). A reação foi incubada à  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos e  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Um volume de 100  $\mu$ L de cada amostra foi aplicado à lâmina 4x180K, a qual foi acondicionada à  $65^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 20 horas.

A lavagem das lâminas consistiu em banhos consecutivos das soluções *Wash Buffer 1* por 5 minutos, *Wash Buffer 2* por 1 minuto, acetonitrila por 10 segundos e solução de estabilização e secagem por 30 segundos.

### **3.6.2. Análise dos dados de aCGH**

As lâminas foram digitalizadas utilizando *Agilent DNA Scanner* numa resolução de 5  $\mu\text{m}$  e os dados foram extraídos pelo software *Feature Extraction 10.1.1.1* (Agilent Technologies). Os dados de aCGH foram analisados no software Nexus Copy Number versão 6.0 (Biodiscovery). Para essa análise, foram utilizados o algoritmo estatístico FASST2,

threshold  $1.00E-6$  e presença de no mínimo 3 sondas consecutivas com valores  $-0,3 \leq \log_2 \geq 0,3$  para considerar um determinado segmento como possível região de perda ou ganho. Além disso foram considerados os valores de  $-0,13$  para perda genômica,  $-0,8$  para perda homozigota e  $0,3$  para ganho genômico e intervalos de 50kbp entre as sondas para identificação de alterações. Dessa maneira, foram geradas as alterações no número de cópias (CNAs) estatisticamente significativas.

### **3.7. Microarranjos de cDNA**

#### **3.7.1. Extração de RNA**

As amostras utilizadas para a extração de RNA foram as células de câncer de mama MACL-1, MACL-1 irradiada com 20 Gy de radiação gama, irradiadas segundo o item 3.2, MGSO-3 e células de mama normal, extraídas e cultivadas segundo o item 3.1.2. A extração de RNA foi realizada utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Resumidamente, células em cultura foram tripsinizadas e centrifugadas a  $250 \times g$ , por 5 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a contagem de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células em câmara de Neubauer, que foram utilizadas na extração. As células foram lisadas adicionando o tampão RLT, de acordo com a quantidade de células utilizada e imediatamente homogeneizadas. Em seguida, foi adicionado um volume de etanol 70% ao lisado, e 700  $\mu$ l dessa mistura foi transferida para a coluna da Qiagen, acoplada a uma coluna de descarte, e centrifugada por 15 segundos, a  $8000 \times g$ . O eluato foi descartado e adicionou-se 700  $\mu$ l de buffer RW1 na coluna, centrifugando novamente por 15 segundos, a  $8000 \times g$ , descartando o que saiu da coluna. Após essa etapa, adicionou-se 500  $\mu$ l de buffer RPE à coluna, centrifugando por 15 segundos, a  $8000 \times g$  e uma segunda vez adicionados 500  $\mu$ l de buffer RPE, mas dessa vez centrifugando por 2 minutos, a  $8000 \times g$ . A coluna da Qiagen foi então transferida para um novo tubo de descarte e centrifugou-se a velocidade de  $13400 \times g$ , para retirar qualquer excesso de etanol que ainda estivesse na coluna. Finalmente, a coluna da Qiagen foi

colocada em um tubo novo de 1,5 ml, adicionando ao centro da coluna de 30-50 µl de água livre de RNase, centrifugando por 1 minuto, a 8000 x g. O RNA foi então dosado em espectrofotômetro, observando-se as razões A260/280 e A260/230 nm, preferencialmente utilizando-se o RNA que apresentava esses valores acima de 1.8. Esse mesmo RNA foi tratado com DNase para retirar possíveis vestígios de DNA genômico advindos da extração de RNA. Para isso, utilizou-se RQ1 RNase-free DNase (Promega), seguindo as normas do fabricante. De forma resumida, de 1-5 µg de RNA foi tratado com 1 U de DNase à 37 °C, por 30 minutos, procedendo-se para a limpeza da reação utilizando-se novamente o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Para isso, o volume foi ajustado para 100 µl de água livre de RNase (quando necessário) e adicionou-se 350 µl de buffer RLT, misturando por pipetagem e, em seguida, 250 µl etanol (96-100%), misturando bem. Os 700 µl dessa mistura foram transferidos para a coluna da Qiagen, acopladas a uma coluna de descarte. Em seguida, adicionou-se 500 µl de buffer RPE à coluna, centrifugando por 15 segundos, a 8000 x g e uma segunda vez adicionados 500 µl de buffer RPE, centrifugando por 2 minutos, a 8000 x g. A coluna da Qiagen foi então transferida para um novo tubo de descarte e centrifugou-se a velocidade de 13400 x g, para retirar qualquer excesso de etanol que ainda estivesse na coluna. Finalmente, a coluna da Qiagen foi colocada em um tubo novo de 1,5 ml, adicionando-se ao centro da coluna de 10-20 µl de água livre de RNase, centrifugando por 1 minuto, a 8000 x g. Novamente, o RNA foi dosado em espectrofotômetro, sendo utilizados nos passos seguintes os RNAs que apresentavam razões de A260/280 e A260/230 nm acima de 1.8. A qualidade e integridade do RNA também foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Quando não utilizado, o RNA foi armazenado a - 80 °C.

### **3.7.2. Síntese cDNA fita dupla**

Para a síntese do cDNA fita dupla foi utilizado o kit SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Life Technologies), de acordo com as normas do fabricante. Para síntese da primeira fita, a 10 µg de RNA foi adicionado 1 µl de oligodT<sub>(18)</sub> primer, completando-se o volume para 11 µl de água livre de RNase, incubando-se a mistura à 70 °C por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados: 4 µl de 5X First Strand buffer, 0.1 M DTT, 10 mM dNTP

mix, aqueceu-se à 42 °C por 2 minutos e adicionou-se 2 µl da enzima SuperScript II RT, incubando a mistura final à 42 °C por 60 minutos. Procedeu-se, então, para a síntese da segunda fita, adicionando-se à mistura anterior os seguintes reagentes: 91 µl de água livre de RNase, 30 µl do 5X Second Strand buffer, 3 µl de 10 mM dNTP mix, 1 µl de 10 U/µl DNA ligase, 4 µl de 10 U/µl DNA polimerase I e 2 U/µl RNase H, totalizando um volume de 150 µl. Essa solução foi incubada à 16 °C por 2 horas, acrescentando-se depois 2 µl de 5 U/µl de T4 DNA polimerase, incubando-se à 16 °C por mais 5 minutos. Para parar a reação, 10 µl de 0.5 M EDTA foi acrescentado. Para a limpeza de RNA residual, as amostras foram tratadas em seguida com 1 µl de 4 mg/ml de RNase A, à 37 °C durante 10 minutos. Para a retirada de proteínas e sais foi acrescentada à reação o mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando a 15700 x g, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Para a precipitação do cDNA fita-dupla foram utilizados 16 µl de 7.5 M acetato de amônio, 7 µl de glicogênio a 5 mg/ml e 326 µl de álcool absoluto gelado, centrifugando imediatamente a 15700 x g por 20 minutos. Os pellets foram então lavados duas vezes com 500 µl de etanol 80%, centrifugando a 15700 x g por 5 minutos cada vez. Os pellets foram secos à temperatura ambiente e as amostras reidratadas com 20 µl de água livre de RNase/DNase. O cDNA foi dosado em espectrofotômetro, sendo utilizados nos passos seguintes os cDNAs que apresentavam razões de A260/280 e A260/230 nm acima de 1.8.

A síntese do cDNA foi verificada com a amplificação de um produto de PCR utilizando iniciadores para o gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A amplificação pelo iniciador *forward* (5' TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC 3') e *reverse* (5' ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3') gerou um produto de amplificação de 188 bp. Para a reação foi adicionado 1 µL de cDNA de cada amostra a uma solução contendo 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega), tampão 1X, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix e 10 µM de cada iniciador, completando-se o volume com água livre de DNase para 10 µl. A reação de amplificação foi programada como: 94 °C por 3 minutos e 15 segundos, seguidos de 25 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 3 minutos utilizando-se o termociclador PTC-100 (MJ Research. Inc.). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% , utilizando brometo de etídeo para visualização.

Em seguida, as amostras foram enviadas a Helixxa Serviços Genômicos (Campinas, SP) para avaliação da qualidade do cDNA e realização dos microarranjos. A qualidade do cDNA fita-dupla foi avaliada pelo aparelho BioAnalyzer 2100 (Agilent), que gerou gráficos de fluorescência *versus* pares de base, além de eletroferogramas representativos da corrida.

### 3.7.3. Microarranjo e análise dos dados

Os microarranjos foram realizados na empresa Helixxa Serviços Genômicos, utilizando-se a plataforma Human Gene Expression 12x135K Arrays (Roche NimbleGen Inc.), chip em que 12 amostras são analisadas simultaneamente, cobrindo um total de 45,033 variantes de genes. Para tal, triplicatas de cada cDNA (MACL-1, MACL-1 irradiada, MGSO-3 e células normais) foram utilizadas em cada arranjo, totalizando 12 amostras.

Após a marcação das amostras com Cy3, procedeu-se para a hibridização e as lâminas marcadas foram escaneadas no comprimento de onda relativo a Cy3 (532 nm). A fluorescência interna de cada arranjo foi ajustada (*autogain*) e, a partir dos dados gerados pelo escaneamento, os arranjos foram verificados com relação ao controle interno (STC - *sample tracking control*) a fim de confirmar ausência de contaminação entre as amostras.

Além do controle de STC os dados foram normalizados no software NimbleScan (Roche), como descrito por Bolstad e colaboradores (Bolstad *et al.*, 2003). A informação gênica foi gerada no mesmo software utilizando o algoritmo RMA (*Robust Multichip Average*) como descrito por Irizarry e colaboradores (Irizarry *et al.*, 2003a; Irizarry *et al.*, 2003b).

Em seguida, usando a plataforma Matlab, as intensidades de sinal de fluorescência das amostras foram normalizadas contra as intensidades do sinal de fluorescência das células normais para que somente fossem considerados os genes diferencialmente expressos no câncer. Gráficos do tipo “volcano plot” (Cui, Churchill, 2003) foram gerados e os genes que apresentavam *fold-change* maior que 2 (tanto para mais quanto para menos) e  $p < 0.05$  pelo teste t de Student foram escolhidos para análise preliminar dos genes diferencialmente expressos nas linhagens de câncer de mama. Além disso, o conjunto de genes diferencialmente expressos foi classificado através da ferramenta *Onto Express*



(<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>) (Khatri *et al.*, 2002) a fim de determinar os processos biológicos relacionados a esses genes, a partir do registro de “GO-term” da ferramenta *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>), utilizando a informação de símbolo do gene registrado no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

### 3.8. PCR em tempo real

#### 3.8.1. Escolha dos genes constitutivo e genes candidatos

Para o início dos experimentos de quantificação relativa foi necessária a escolha de genes endógenos. Para a escolha desses genes constitutivos, uma pesquisa exaustiva da literatura mostrou que há uma dificuldade na escolha de genes endógenos para câncer de mama e também outros tipos de câncer. Vários trabalhos avaliam a adequação de genes comumente descritos como constitutivos para estudos sobre câncer de mama (Radonic *et al.*, 2004; McNeill *et al.*, 2007; Lyng *et al.*, 2008). Entretanto, esses mesmos trabalhos demonstram que muitos desses genes são inadequados para servirem como constitutivos para este tipo de câncer. Isso se deve principalmente à natureza do câncer, em que vários genes de vias metabólicas estão alterados de forma muitas vezes imprevisível. Um exemplo é o gene *GAPDH* que se mostra alterado em muitos tipos de câncer (Lyng *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012) apesar de largamente utilizado como constitutivo.

Inicialmente os genes *ACTB* (*actin beta*), *MRPL19* (*mitochondrial ribosomal protein L19*), *RPS27A* (*ribosomal protein S27a*), *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) e *TBP* (*TATA-box binding protein*) foram escolhidos como candidatos a genes constitutivos. Todos esses genes não mostraram expressão alterada em relação ao controle de mama normal no microarranjo. Entretanto, em uma sondagem inicial observando-se os valores de Ct apenas *HPRT* e *TBP* apresentaram nível de expressão constante suficiente para aplicação nesse trabalho. Portanto, após testes iniciais, os genes constitutivos escolhidos para análise em PCR em tempo real foram o *TBP* e *HPRT*.

Alguns genes candidatos do microarranjo foram escolhidos para validação da expressão gênica através de PCR em tempo real, observando-se três critérios principais:

interesse nas características do gene, maior *fold-change* (positivo ou negativo) e maior significância estatística.

Abaixo se encontram o nível de expressão desses genes nas células MACL-1 e MGSO-3 (Tabelas 3 a 9) e seu valor de “p” segundo o teste t de Student.

**- ATF5 – activating transcription factor 5**

Tabela 3: *Fold-change* e p-valor do gene *ATF5* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	559.1	1,40E-07
MGSO-3	163	0.006

**- B4GALT1 – UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1**

Tabela 4: *Fold-change* e p-valor do gene *B4GALT1* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	124,5	4,17E-06
MGSO-3	189,7	5,48E-05

**- CAST – calpastatin**

Tabela 5: *Fold-change* e p-valor do gene *CAST* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	45,1	1,05E-05
MGSO-3	59	0.0001

**- LARP1 – *La ribonucleoprotein domain family, member 1***

Tabela 6: *Fold-change* e p-valor do gene *LARP1* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	30	0.01
MGSO-3	44	1.15E-06

**- RDH10 – *retinol dehydrogenase 10 (all-trans)***

Tabela 7: *Fold-change* e p-valor do gene *RDH10* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	57,8	8,89E-08
MGSO-3	55,9	4,66E-05

**- SFN – *stratifin ou 14-3-3 sigma (14-3-3σ)***

Tabela 8: *Fold-change* e p-valor do gene *SFN* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	-90	3.10E-07
MGSO-3	-95	5.84E-05

**- VDR – *vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor***

Tabela 9: *Fold-change* e p-valor do gene *VDR* nas linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Linhagem	<i>Fold-change</i>	p-valor
MACL-1	19	5.75E-07
MGSO-3	10	0.007

### 3.8.2. Reação de PCR em tempo real

A tabela 10 mostra a sequência 5'-3' dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Tabela 10: Sequência de iniciadores dos genes candidatos aos experimentos de PCR em tempo real.

<b>Gene</b>	<b>Primer <i>forward</i></b>	<b>Primer <i>reverse</i></b>
<b><i>ATF5</i></b>	GCTGGGATGGCTCGTAGACTAT	AACTCGCTCAGTCATCCAGTCA
<b><i>B4GALT1</i></b>	GCATGATCCGCCACTCAAG	TGCAATTCGGTCAAACCTCTG
<b><i>CAST</i></b>	AACCCAAGCCTCGGAGTGAATCAGA	TGGAGCAGCGGCCTTAGATTCTTCT
<b><i>HPRT</i></b>	TGGCGTCGTGATTAGTGATGA	CATCTCGAGCAAGACGTTCACT
<b><i>LARP1</i></b>	GGACGCCAAAGAAGGCTACA	CCATACAGTTGGCCAGCTTCA
<b><i>RDH10</i></b>	CATGCACACTTCTGGACCACTAA	CCTCAACTCCGGCAGTACTGA
<b><i>SFN</i></b>	TCTCCTGCGAAGAGCGAAAC	GAGCCCTCCTCGTTGCTTTT
<b><i>TBP</i></b>	CCCCATGACTCCCATGAC	AATATTTTGCAGCTGCGGTACAAT
<b><i>VDR</i></b>	TGAAGCGGAAGGAGGAGGA	CGAACTGGAGGCCGGAA

Para cada par de iniciadores foi determinada a curva de eficiência, sendo aceitos primers com eficiência de 90 a 110%. Cada vez que o par de iniciadores não atingia esses parâmetros, novos iniciadores eram desenhados e manufacturados. Também não foram aceitos iniciadores que apresentassem mais de uma amplificação na curva de dissociação (verificada a cada reação de PCR).

Para fins de otimização, avaliamos concentrações de DNA entre 0,01 ng a 100 ng, sendo que a concentração de uso escolhida foi a de 100 ng. Para cada avaliação foram utilizados *pools* de cDNA de três extrações diferentes de RNA de MACL-1 e MGSO-3.

O *fold-change* foi avaliado com relação a quatro tipos diferentes de tecidos de mama normal (extraídos de quatro pacientes diferentes). Entre esses quatro tipos, a amostra utilizada no microarranjo foi contemplada para fins de confirmação do resultado. Essa comparação foi realizada dessa maneira para que obtivéssemos dados de expressão

contra diferentes tecidos normais, evitando uma tendência em relação ao resultado do microarranjo como poderia ocorrer caso fizéssemos um *pool* de cDNA de células normais.

Em cada placa de PCR de 96 poços também foram incluídos pelo menos duas replicatas de amostras da reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase-reversa (Controle –RT) e duas replicatas de amostras da reação de síntese de cDNA sem RNA (Controle –RNA). Estes controles serviram para monitorar a presença de contaminantes de DNA (Controle –RT) e RNA (Controle –RNA) durante a síntese de cDNA.

Foi utilizado o equipamento Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies) do NAGE (Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica) da UFMG e as condições de amplificação foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Imuno-histoquímica

Tumores primários das pacientes, células em cultura derivadas dos tumores primários e cultivadas em cultura bidimensional, bem como tumores originados da injeção das células no dorso de camundongos Nude foram avaliados por imuno-histoquímica.

O resultado da imuno-histoquímica é exibido na Tabela 11.

Tabela 11: Perfil imunohistoquímico dos tumores primários das pacientes (Pacientes 1 e 2), células em cultura (MACL-1 and MGSO-3) e tumores implantados em camundongos Nude derivados das linhagens celulares (Implantes de células).

Anticorpo	Paciente		Células em cultura		Implante de células	
	1	2	MACL-1	MGSO-3	MACL-1	MGSO-3
RE	+	-	-	-	-	-
RP	+	-	-	-	-	-
HER2	-	+	-	-	-	-
Ki-67	+	+	+	+	+	+
CD44	-	-	-	-	-	-
CD24	-	+	-	-	-	-
CD133	-	-	-	-	-	-
CK5	-	-	-	-	-	-
EGFR	-	-	-	-	-	-

Um painel demonstrativo com o perfil imunohistoquímico dos anticorpos classicamente avaliados para câncer de mama é mostrado na Figura 1 para o conjunto de tumores e células relacionados à MACL-1.

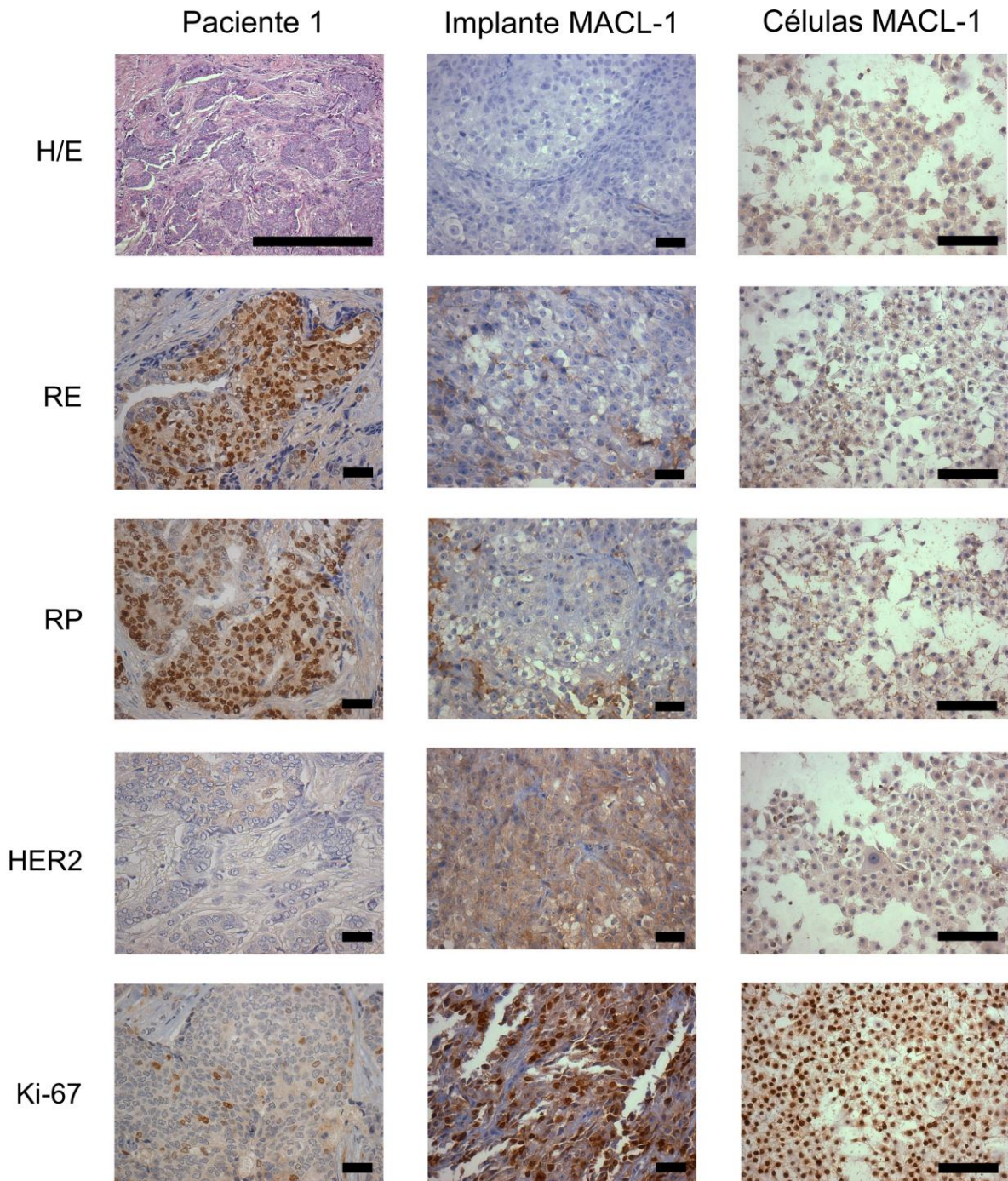


Figura 1: Perfis imunohistoquímicos de RE, RP, HER2 e Ki-67 das amostras de tumor da Paciente 1 (Paciente 1), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MACL-1 (Implante MACL-1) e das células MACL-1 (Células MACL-1). Barra: 100  $\mu$ m

Segundo o perfil histopatológico e imunohistoquímico exibido pelo tumor primário da Paciente 1, o câncer de mama pode ser classificado como carcinoma ductal invasor de mama, do sub-tipo luminal A (Sorlie *et al.*, 2001), ou seja, RE/RP positivo e HER2 negativo.



Além disso, esse tumor possui baixo grau mitótico, observado tanto na coloração por H&E quanto pela marcação pelo anticorpo Ki-67 (menor que 14%). As células em cultura e os implantes de tumor em camundongos Nude demonstraram relevante grau mitótico, mas ausência de marcação para os demais anticorpos, como pode ser visto na Figura 2, que exhibe o painel dos demais anticorpos avaliados.

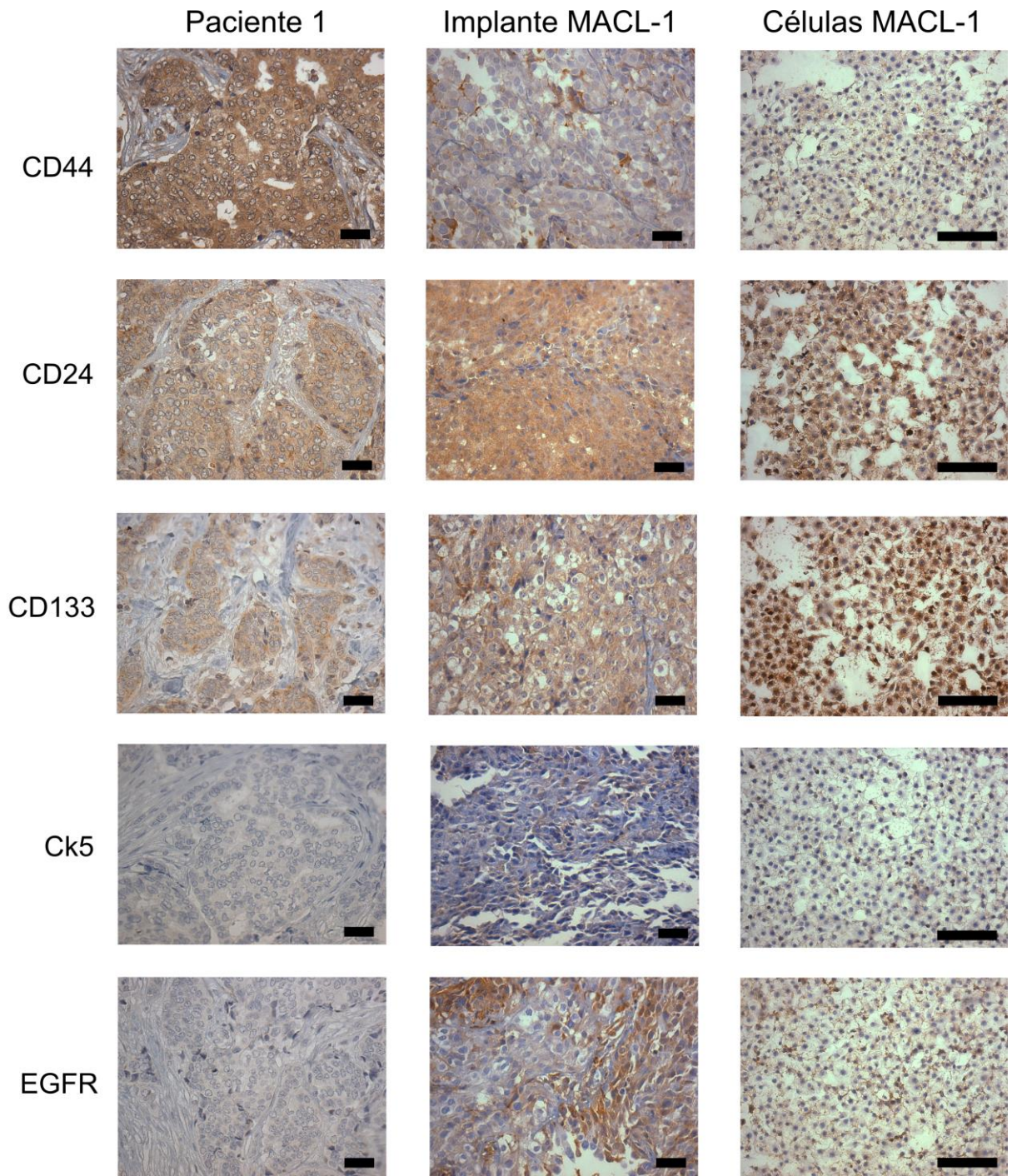


Figura 2: Perfis imunohistoquímicos de CD44, CD24, CD133, Ck5 e EGFR das amostras de tumor da Paciente 1 (Paciente 1), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MACL-1 (Implante MACL-1) e das células MACL-1 (Células MACL-1). Barra: 100  $\mu$ m.

A Figura 3 mostra um painel demonstrativo com o perfil dos anticorpos classicamente avaliados para câncer de mama para o conjunto de tumores e células relacionados à MGSO-3.

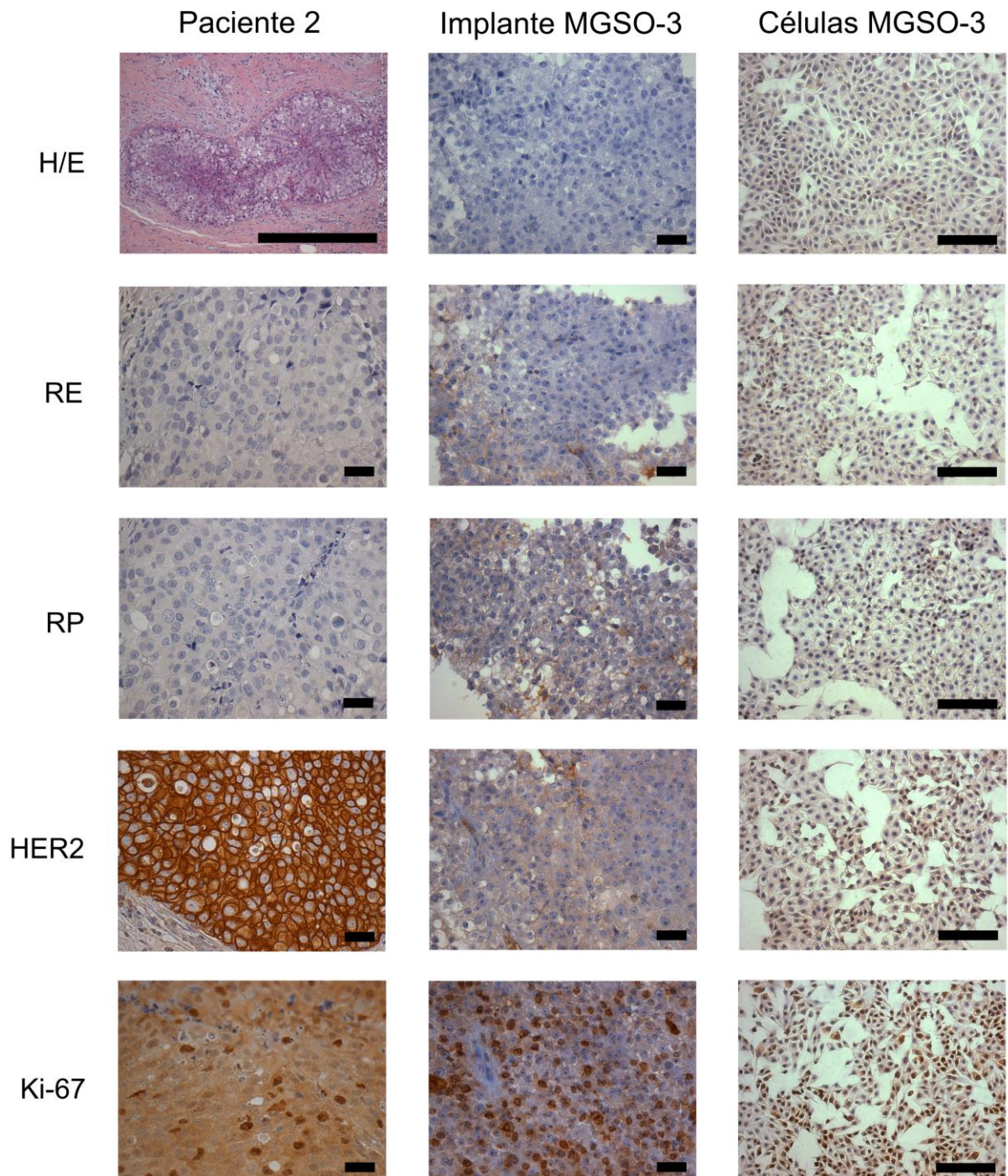


Figura 3: Perfis imunohistoquímicos de RE, RP, HER2 e Ki-67 das amostras de tumor da Paciente 2 (Paciente 2), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MGSO-3 (Implante MGSO-3) e das células MGSO-3 (Células MGSO-3). Barra: 100  $\mu$ m.

Segundo o aspecto histopatológico e imunohistoquímico exibido pelo tumor primário da Paciente 2, o câncer de mama pode ser classificado como carcinoma de mama ductal *in situ*, do sub-tipo HER2 (Sorlie *et al.*, 2001), ou seja, RE/RP negativo e HER2 positivo, com alto grau mitótico (maior que 25%). Além disso, o tumor primário apresentou marcação positiva para o anticorpo CD24, embora as células em cultura e o tumor em camundongo Nude não, como pode ser visto na Figura 4.

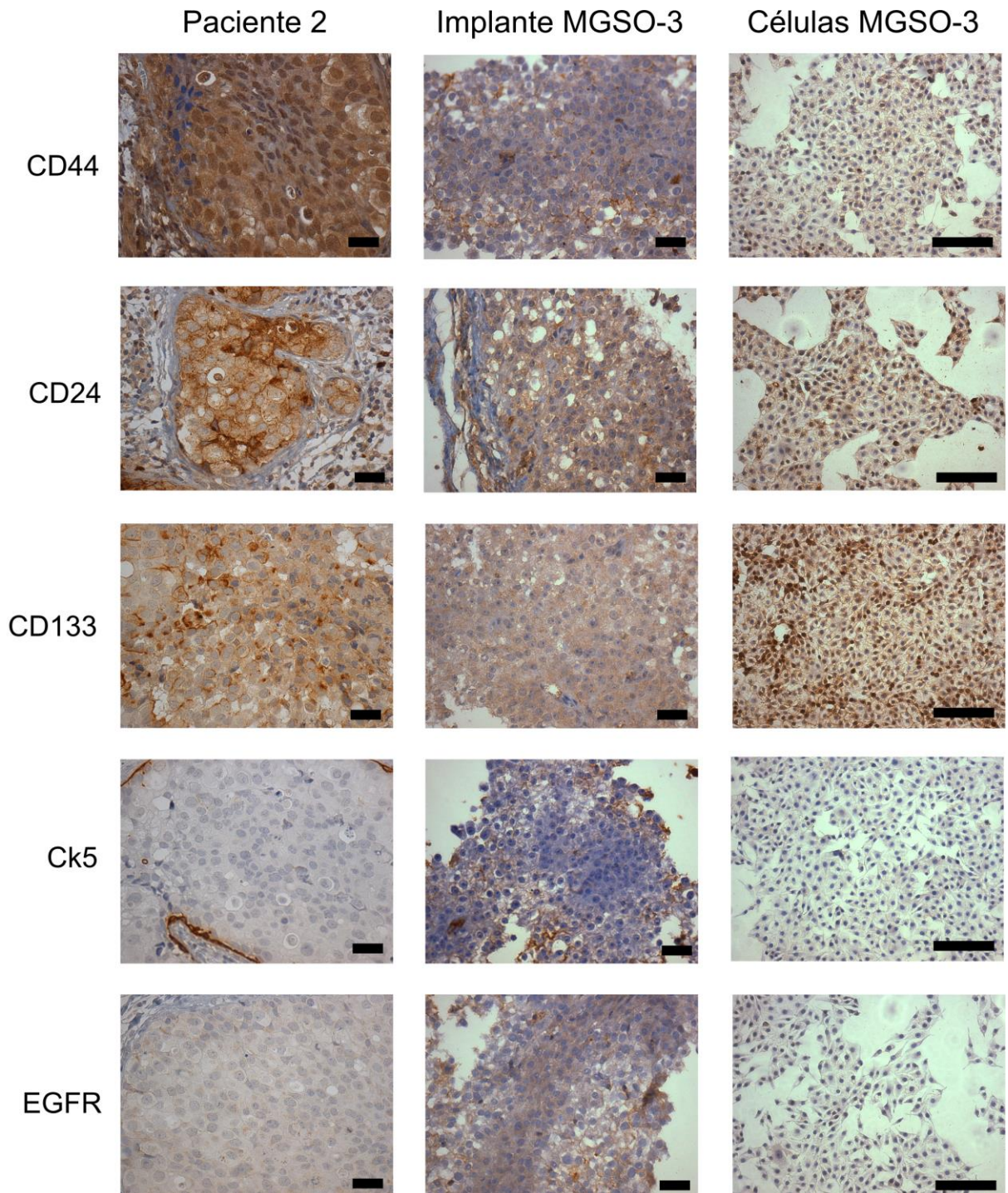


Figura 4: Perfis imunohistoquímicos de CD44, CD24, CD133, Ck5 e EGFR das amostras de tumor da Paciente 2 (Paciente 2), dos tumores implantados derivados da linhagem celular MGSO-3 (Implante MGSO-3) e das células MGSO-3 (Células MGSO-3). Barra: 100  $\mu$ m.

Os marcadores de células-tronco CD44 e CD133, e os de fenótipo basal Ck5 e EGFR foram negativos em todas as condições avaliadas (Figura 4).

#### **4.2. Estudo citogenético**

O perfil cromossômico das células de câncer MACL-1 e MGSO-3 foi determinado através da cariotipagem por bandeamento G no Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), da UFMG. Essa técnica permite a visualização de anormalidades cromossômicas como ganhos e perdas de parte ou de todo um cromossomo.

O estudo citogenético realizado no laboratório NUPAD da UFMG mostrou que todas as metáfases (3) se mostraram hipodiplóides em MACL-1 (30 a 37 cromossomos) e MGSO-3 (31 a 38 cromossomos).

Entre os cromossomos normais encontrados em MACL-1 estão: 2, 12, 14, 15, 16, 17, 21, 22 e X. Em MGSO-3 mantiveram-se normais os cromossomos 2, 12, 14, 16, 21, 22 e X.

A Figura 5 mostra o perfil gerado após a técnica de bandeamento G para as células em cultura MACL-1 e MGSO-3. Os laudos gerados pelo NUPAD se encontram no Anexo 3.

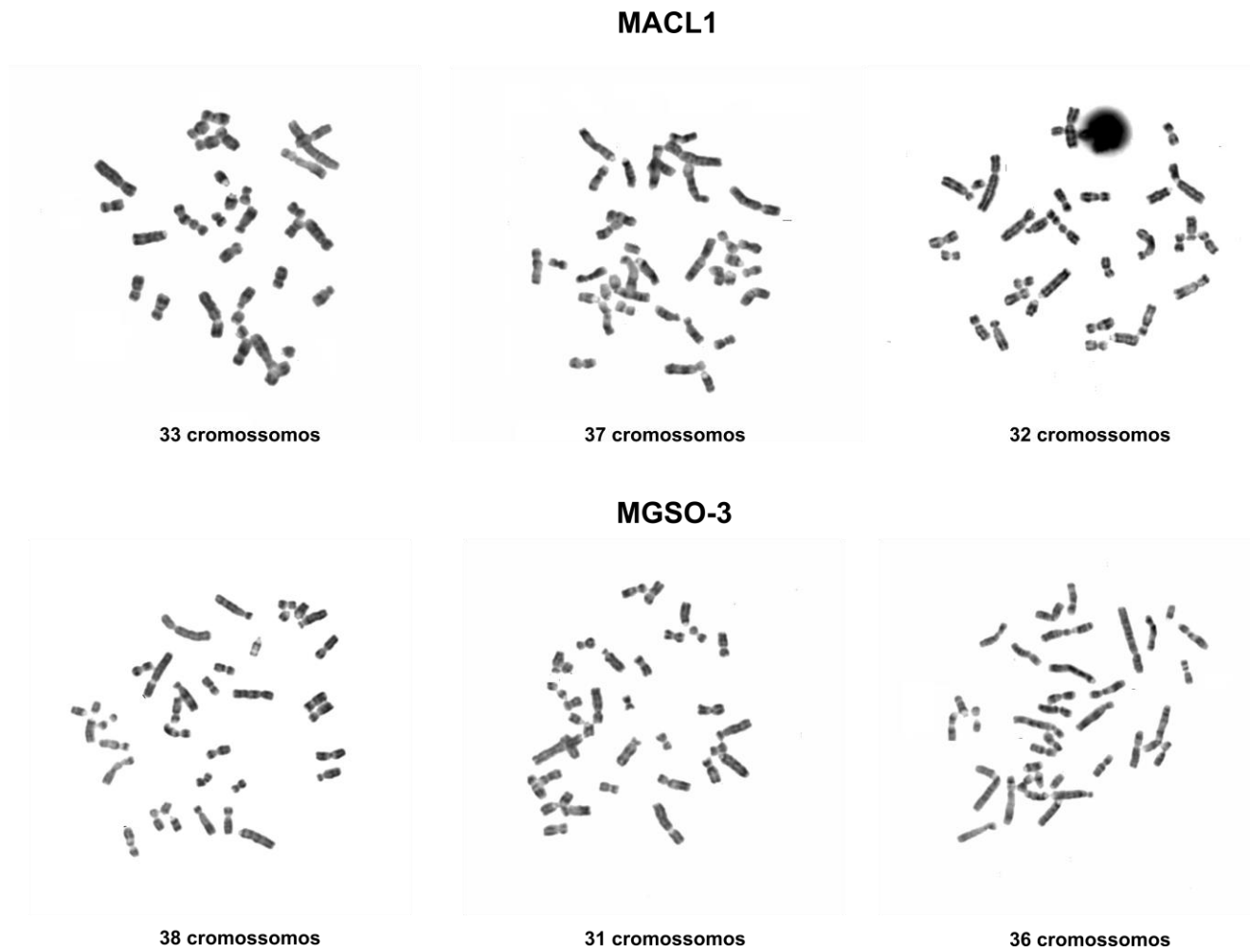


Figura 5: Metáfases das linhagens de células MACL-1 e MGSO-3 evidenciadas por bandeamento G.

O segundo estudo citogenético, realizado no laboratório NeoGene do Hospital A. C. Camargo, confirmou que ambas linhagens celulares são hipodiplóides. Foram analisadas no mínimo 20 metáfases de cada tipo celular.

A Figura 6 mostra uma imagem representativa de uma metáfase da célula MACL-1 obtida pelo bandeamento por DAPI. A parte (a) demonstra uma visão geral da metáfase, enquanto a parte (b) assinala pontos em que houve alterações estruturais evidentes, detectadas pela patologista especializada.

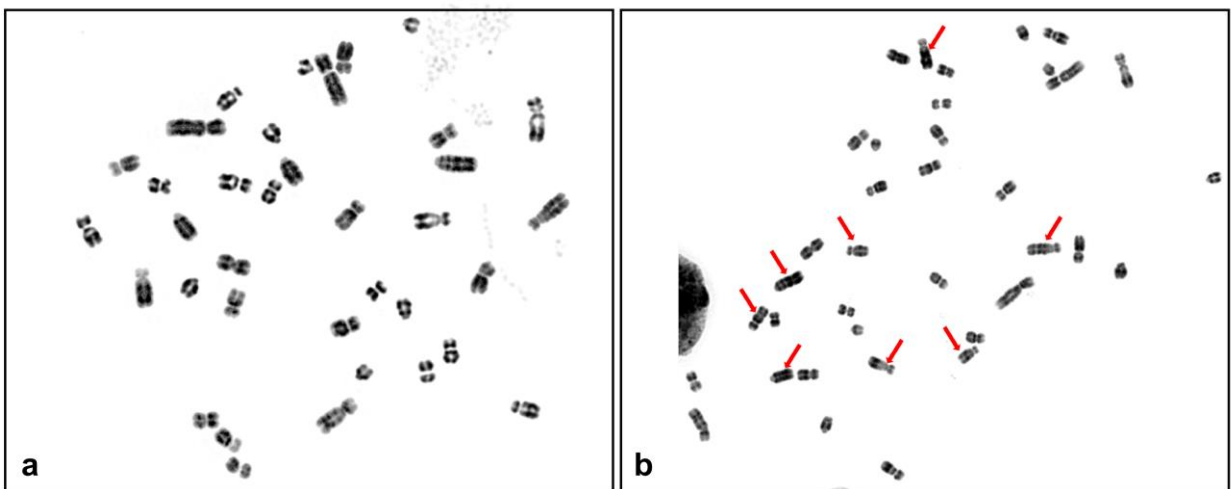


Figura 6: Metáfases de células MACL-1 evidenciadas por coloração por DAPI. (a) perfil geral da metáfase. (b) as setas vermelhas indicam pontos de alterações estruturais evidentes nos cromossomos.  $2n = 37$  cromossomos.

A análise realizada pelo Laboratório NeoGene atestou que as células MACL-1 possuíam de 35 a 37 cromossomos, e foram encontrados os mesmos cromossomos considerados normais pela análise do NUPAD.

A Figura 7, mostra uma imagem representativa de uma metáfase da célula MGSO-3 obtida pelo bandeamento por DAPI. A parte (a) demonstra uma visão geral da metáfase, e a parte (b) mostra pontos em que houve alterações estruturais evidentes.



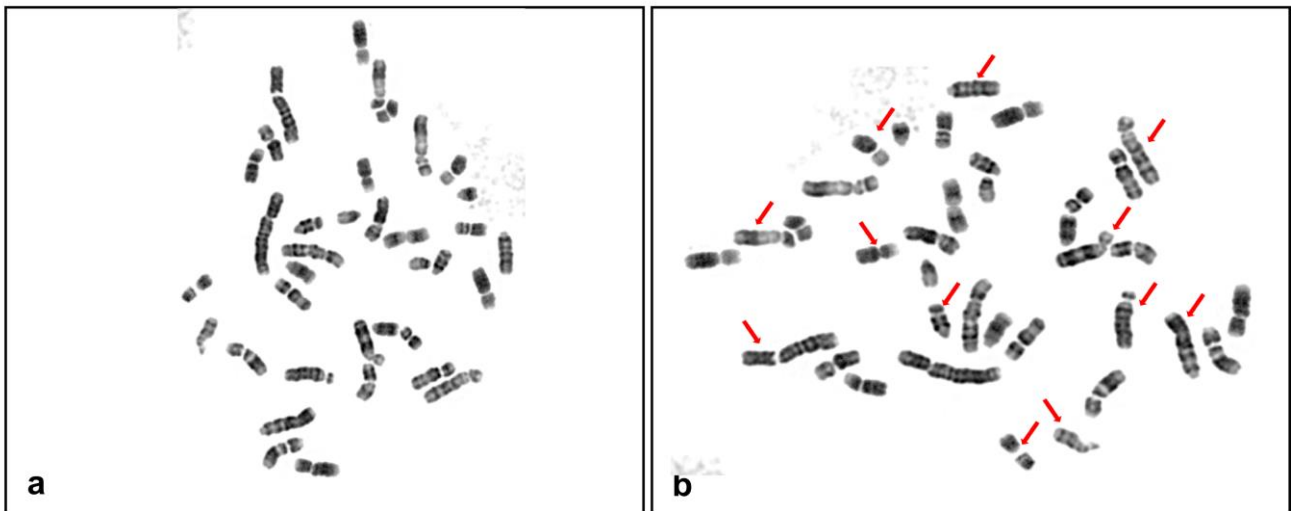


Figura 7: Metáfases de células MGSO-3 evidenciadas por coloração por DAPI. (a) perfil geral da metáfase. (b) as setas vermelhas indicam pontos de alterações estruturais evidentes nos cromossomos.  $2n= 36$  cromossomos.

A análise realizada pelo Laboratório NeoGene atestou que as células MGSO-3 possuíam de 34 a 37 cromossomos, com várias alterações numéricas e estruturais. Assim como para MACL-1 foram encontrados os mesmos cromossomos considerados normais pela análise do NUPAD.

#### 4.3. Hibridação genômica comparativa baseada em arranjos (aCGH)

Para os experimentos de aCGH as células tiveram seu gDNA extraído através da lise por SDS/proteinase K e extração por fenol-clorofórmio. A Figura 8 mostra o perfil eletroforético do DNA genômico (gDNA) das linhagens MACL-1 e MGSO-3 em gel de agarose.

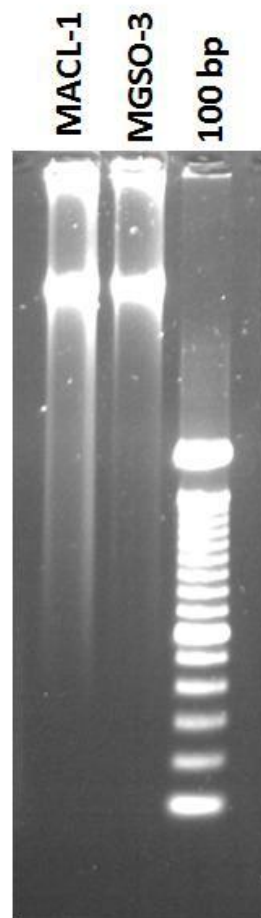


Figura 8: Perfil eletroforético do DNA genômico das células MACL-1 e MGSO-3 após extração por lise com SDS/proteinase K e purificação por fenol-clorofórmio. 100 bp: marcador 100 bp DNA ladder (Life Technologies). Gel de agarose a 0,8%.

Após verificação da qualidade do DNA no Nanodrop, procedeu-se para digestão do DNA pelas enzimas AluI e RsaI. A extensão da digestão foi verificada em gel de agarose, como pode ser visto na Figura 9.

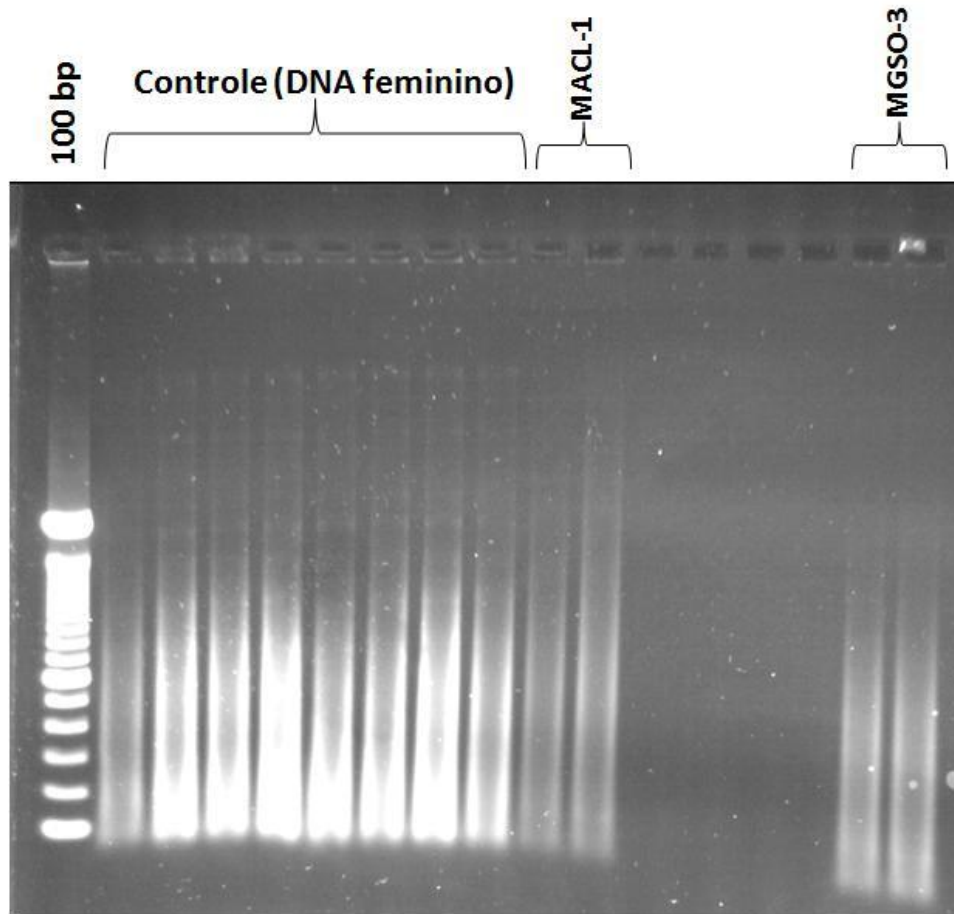


Figura 9: Perfil de digestão das amostras controle (DNA feminino), MACL-1 e MGSO-3. 100 bp: marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Gel de agarose a 0,8%.

Após digestão, os DNAs digeridos de MACL-1 e MGSO-3 e da amostra controle foram marcados utilizando o kit Agilent genomic DNA enzymatic labeling kit (Agilent Stratagene, Agilent Technologies). A marcação foi feita em *dye swap* e foi verificada através da coloração das amostras durante a purificação na coluna de Microcon, bem como no Nanodrop, em que foram aceitas eficiências de Cy3 entre 25-40 pmol/ $\mu$ L e Cy5 entre 20-35 pmol/ $\mu$ L. Após nova purificação, o DNA foi hibridizado à lâmina SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies), a lâmina foi lavada, seca e procedeu-se para o escaneamento.

Após digitalização das imagens das lâminas no equipamento *Agilent DNA Scanner* e extração dos dados pelo software *Feature Extraction 10.1.1.1* (Agilent Technologies, CA,

USA), os dados de aCGH foram analisados no software Nexus Copy Number versão 6.0 (Biodiscovery).

A análise pelo Nexus permitiu a construção da Figura 10, que mostra extensas alterações cromossômicas presentes nas células MACL-1 e MGSO-3, muitas delas detectadas nas duas replicadas de *dye swap* (representada pelas barras de tamanho duplo).

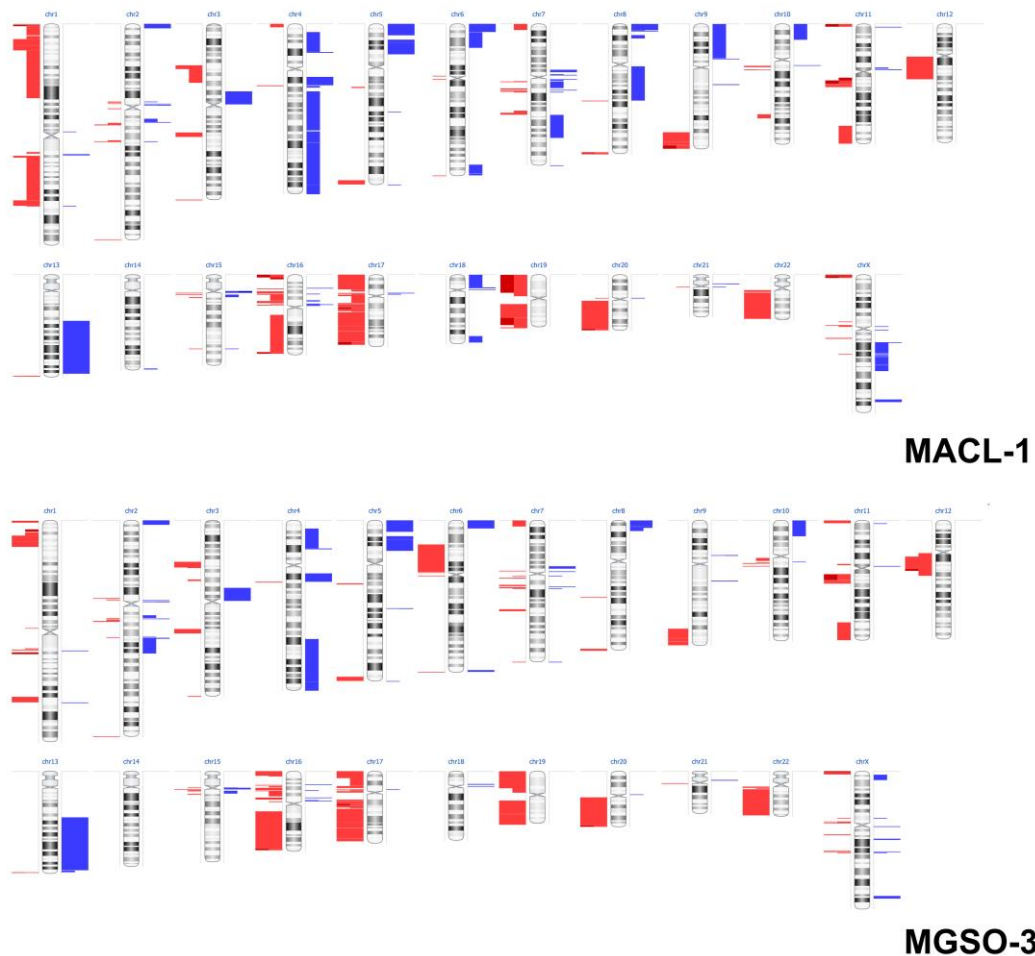


Figura 10: Representação esquemática das alterações do número de cópias das células MACL-1 (acima) e MGSO-3 (abaixo) utilizando a plataforma de hibridização SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies). Barras vermelhas representam perdas e barras azuis representam ganhos. Barras de tamanho duplo representam alterações detectadas nas replicatas de *dye swap*.

O número de alterações cromossômicas ou alterações no número de cópias (também conhecido como CNA – *copy number alteration*) atribuídas a linhagem MACL-1 foi de  $172.5 \pm$

30.4, enquanto para MGSO-3 foi de  $166.5 \pm 12$ . Entretanto, quando considera-se somente alterações que ocorreram nas duas replicatas de *dye swap* e com  $p < 0.05$ , somente 31 CNAs ocorreram em MACL-1 e 33 CNAs em MGSO-3, sendo todas caracterizadas como perdas genômicas (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Regiões cromossômicas alteradas em MACL-1, presente nas duas replicatas e com  $p$ -valor  $< 0.05$ .

Região	Evento	Tamanho	Citobanda	p-valor
chr22:20,247,200-49,565,875	Perda	29318676	q11.21 - q13.33	1,50E-52
chr20:29,297,270-60,619,913	Perda	31322644	q11.1 - q13.33	2,61E-39
chr11:63,421,604-67,222,297	Perda	3800694	q13.1 - q13.2	4,86E-33
chr19:32,964,337-47,953,667	Perda	14989331	q13.11 - q13.32	3,64E-29
chr9:121,586,915-132,084,237	Perda	10497323	q33.1 - q34.11	9,15E-25
chr17:0-16,531,500	Perda	16531501	p13.3 - p11.2	2,18E-22
chr9:136,252,154-140,138,805	Perda	3886652	q34.2 - q34.3	1,20E-21
chr12:36,761,973-62,175,415	Perda	25413443	q11 - q14.1	6,17E-20
chr17:42,143,048-57,671,531	Perda	15528484	q21.31 - q23.1	1,03E-19
chr11:200,300-3,210,812	Perda	3010513	p15.5 - p15.4	1,08E-13
chr17:36,548,604-38,591,831	Perda	2043228	q12 - q21.2	7,05E-13
chr16:86,893,477-88,690,615	Perda	1797139	q24.1 - q24.2	8,95E-13
chr17:63,665,720-75,057,558	Perda	11391839	q24.1 - q25.2	1,31E-10
chr17:75,269,931-78,653,589	Perda	3383659	q25.2 - q25.3	1,47E-09
chr1:17,086,698-24,128,048	Perda	7041351	p36.13 - p36.11	2,23E-08
chr1:736,471-1,274,186	Perda	537716	p36.33	1,01E-07
chr5:175,491,949-180,194,370	Perda	4702422	q35.2 - q35.3	4,17E-07
chr8:144,126,747-145,356,609	Perda	1229863	q24.3	4,28E-07
chr9:132,236,638-136,020,787	Perda	3784150	q34.11 - q34.2	4,65E-07
chr20:60,743,360-62,419,593	Perda	1676234	q13.33	4,81E-07
chr22:17,274,835-18,691,763	Perda	1416929	q11.1 - q11.21	1,40E-05
chr17:33,661,605-36,347,121	Perda	2685517	q12	4,51E-05

chr1:1,436,682-2,565,363	Perda	1128682	p36.33 - p36.32	6,68E-05
chr17:57,775,091-63,421,974	Perda	5646884	q23.1 - q24.1	1,77E-04
chr1:24,235,982-29,732,222	Perda	5496241	p36.11 - p35.3	1,96E-04
chr1:198,046,030-204,181,007	Perda	6134978	q31.3 - q32.1	2,31E-04
chr17:38,784,700-40,869,210	Perda	2084511	q21.2	3,59E-04
chr3:121,903,263-126,877,887	Perda	4974625	q21.1 - q21.3	7,12E-04
chr7:99,783,563-101,901,147	Perda	2117585	q22.1	0,002266
chr16:30,240,033-31,862,636	Perda	1622604	p11.2	0,018005
chr17:31,891,535-33,317,141	Perda	1425607	q12	0,018069

Tabela 13: Regiões cromossômicas alteradas em MGSO-3, presente nas duas replicatas e com p-valor < 0.05.

Região	Evento	Tamanho	Citobanda	p-valor
chr16:45,058,242-86,788,521	Perda	41730280	q11.2 - q24.1	2,07E-68
chr22:20,247,200-49,565,875	Perda	29318676	q11.21 - q13.33	1,75E-67
chr20:29,297,270-60,619,913	Perda	31322644	q11.1 - q13.33	4,89E-67
chr11:60,285,342-67,222,297	Perda	6936956	q12.2 - q13.2	1,13E-49
chr9:121,586,915-132,084,237	Perda	10497323	q33.1 - q34.11	1,19E-41
chr19:32,964,337-47,953,667	Perda	14989331	q13.11 - q13.32	2,20E-40
chr6:27,054,075-57,794,175	Perda	30740101	p22.1 - p11.2	4,48E-37
chr19:48,122,394-60,078,783	Perda	11956390	q13.33 - q13.43	6,43E-33
chr17:42,143,048-57,671,531	Perda	15528484	q21.31 - q23.1	1,74E-32
chr1:148,081,769-150,095,304	Perda	2013536	q21.2	1,10E-26
chr9:136,252,154-140,138,805	Perda	3886652	q34.2 - q34.3	4,92E-19
chr17:36,548,604-38,591,831	Perda	2043228	q12 - q21.2	7,12E-19
chr11:200,300-3,210,812	Perda	3010513	p15.5 - p15.4	1,16E-16
chr17:63,665,720-75,057,558	Perda	11391839	q24.1 - q25.2	1,40E-15
chr16:86,893,477-88,690,615	Perda	1797139	q24.1 - q24.2	1,08E-14
chr1:17,086,698-24,128,048	Perda	7041351	p36.13 - p36.11	8,69E-14
chr9:132,236,638-136,020,787	Perda	3784150	q34.11 - q34.2	1,23E-11

chr17:57,775,091-63,421,974	Perda	5646884	q23.1 - q24.1	1,11E-10
chr5:175,491,949-180,194,370	Perda	4702422	q35.2 - q35.3	2,50E-10
chr17:75,269,931-78,653,589	Perda	3383659	q25.2 - q25.3	2,59E-10
chr20:60,743,360-62,419,593	Perda	1676234	q13.33	2,86E-10
chr17:33,661,605-36,347,121	Perda	2685517	q12	1,41E-08
chr8:144,126,747-145,356,609	Perda	1229863	q24.3	2,14E-08
chr17:38,784,700-40,869,210	Perda	2084511	q21.2	5,78E-08
chr1:198,046,030-204,181,007	Perda	6134978	q31.3 - q32.1	7,70E-08
chr1:24,235,982-29,732,222	Perda	5496241	p36.11 - p35.3	1,66E-07
chr22:17,274,835-18,691,763	Perda	1416929	q11.1 - q11.21	1,04E-05
chr3:121,903,263-126,877,887	Perda	4974625	q21.1 - q21.3	1,16E-05
chr1:1,436,682-2,565,363	Perda	1128682	p36.33 - p36.32	0,023762
chr1:736,471-1,274,186	Perda	537716	p36.33	0,002776
chr7:99,783,563-101,901,147	Perda	2117585	q22.1	0,01001
chr16:30,240,033-31,862,636	Perda	1622604	p11.2	0,013394
chr16:29,727,722-30,106,101	Perda	378380	p11.2	0,0174

Algumas alterações em comum puderam ser observadas em MACL-1 e MGSO-3, como perda em grande parte do cromossomo 17 e do cromossomo 19. As perdas no cromossomo 17 ocorreram nas seguintes regiões: 17q12, 17q12-q21.2, 17q21.2, 17q21.31-q23.1, 17q23.1-q24.1, 17q24.1-q25.2, 17q25.2-q25.3 e somam cerca de 43 Mb em tamanho (Tabela 14). Já as perdas no cromossomo 19 são: 19q13.11-q13.32 para MACL-1 e MGSO-3 e 19q13.33-q13.43 em MGSO-3. Essas duas alterações somam em cerca de 27 Mbp em tamanho (Tabela 14).

Também podemos observar que, apesar da cariotipagem atestar uma aparente normalidade no cromossomo 22, algumas perdas aconteceram no braço longo desse cromossomo. Essas perdas são: 22q11.1-q11.21 e 22q11.21-q13.33, somando cerca de 31 Mbp em perdas (Tabela 14).

Tabela 14: Exemplos de regiões cromossômicas alteradas nas linhagens celulares MACL-1 e MGSO-3, presentes em ambas replicatas e com  $Op < 0.05$ .

<b>Cromossomo</b>	<b>Região</b>	<b>Evento</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Citobanda</b>	<b>Linhagem</b>
17	0-16531500	Perda	16531501	p13.3 - p11.2	MACL-1
17	31891535-33317141	Perda	1425607	q12	MACL-1
17	33661605-36347121	Perda	2685517	q12	MACL-1 e MGSO-3
17	36548604-38591831	Perda	2043228	q12 - q21.2	MACL-1 e MGSO-3
17	38784700-40869210	Perda	2084511	q21.2	MACL-1 e MGSO-3
17	42143048-57671531	Perda	15528484	q21.31 - q23.1	MACL-1 e MGSO-3
17	57775091-63421974	Perda	5646884	q23.1 - q24.1	MACL-1 e MGSO-3
17	63665720-75057558	Perda	11391839	q24.1 - q25.2	MACL-1 e MGSO-3
17	75269931-78653589	Perda	3383659	q25.2 - q25.3	MACL-1 e MGSO-3
19	32964337-47953667	Perda	14989331	q13.11 - q13.32	MACL-1 e MGSO-3
19	48122394-60078783	Perda	11956390	q13.33 - q13.43	MGSO-3
22	17274835-18691763	Perda	1416929	q11.1 - q11.21	MACL-1 e MGSO-3
22	20247200-49565875	Perda	29318676	q11.21 - q13.33	MACL-1 e MGSO-3



#### 4.4. Microarranjo

A Figura 11 mostra o perfil eletroforético dos RNAs após extração com o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) e tratamento com DNase (Promega) para descontaminação do DNA genômico.

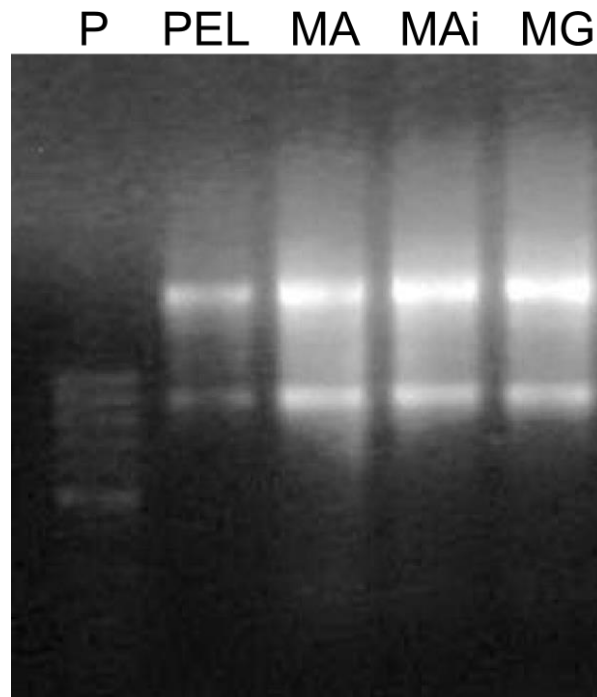


Figura 11: Perfil eletroforético dos RNAs extraídos de células de mama normal (PEL, 400 ng), MACL-1 (MA, 1.5  $\mu$ g), MACL-1 irradiada (MAi, 1.3  $\mu$ g) e MGSO-3 (MG, 1  $\mu$ g). P: 100 bp DNA ladder (Fermentas).

Em seguida, essas amostras foram utilizadas para síntese de cDNA fita dupla utilizando o kit SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Para verificar a síntese do cDNA foi realizada uma reação de PCR utilizando-se iniciadores do gene *GAPDH*. O resultado dessa amplificação pode ser visto na Figura 12.

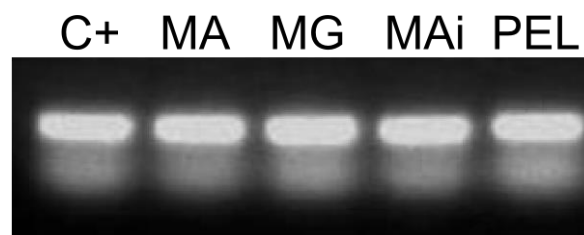
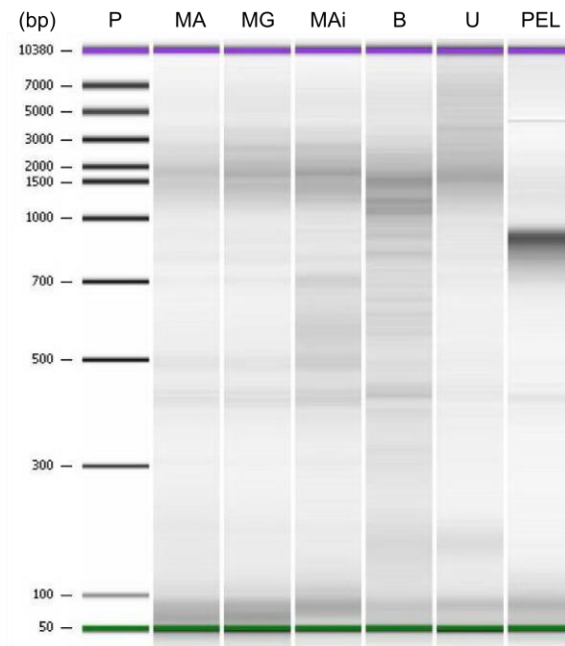


Figura 12: Amplificação do gene *GAPDH* utilizando as amostras de cDNA controle positivo (C+), MACL-1 (MA), MGSO-3 (MG), MACL-1 irradiada (MAi) e células de mama normal (PEL).

Os cDNAs foram então avaliados quanto à sua qualidade e integridade utilizando a plataforma BioAnalyzer 2100, gerando o perfil representativo mostrado na Figura 13.

A



B

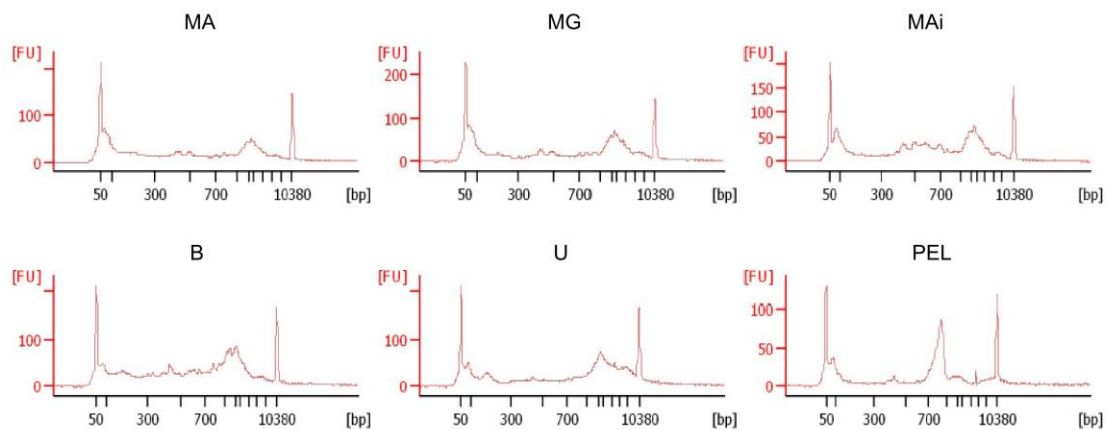


Figura 13: (A) Eletroferograma gerado pelo programa BioAnalyzer, mostrando o perfil do tamanho dos fragmentos presentes nas amostras de cDNAs utilizadas no microarranjo. As amostras B e U são amostras referência para a avaliação da qualidade da síntese de cDNA. (B) Gráfico de fluorescência *versus* pares de bases mostrando o perfil de distribuição de fragmentos, em função do tamanho (em pares de base).

Uma vez constatada a qualidade e compatibilidade desses cDNAs com o experimento de microarranjo, procedeu-se para a marcação das amostras, hibridização no chip Human Gene Expression 12x135K Arrays (Roche NimbleGen Inc.) e leitura da lâmina.

Os dados foram normalizados com o software NimbleScan e utilizando o algoritmo RMA. Em seguida os dados foram analisados no software Matlab, gerando uma lista de genes com p-valor menor que 0.05 e *fold change* superior a 2, utilizando gráficos do tipo “volcano-plot”. Um gráfico “volcano-plot” representativo é demonstrado na Figura 14. As linhas verticais representam a escolha de fold-change pelo pesquisador (*fold change* a partir de 2, para menos ou para mais), enquanto que a linha horizontal representa o *cut-off* para a significância estatística (a partir de  $p < 0.05$ ).

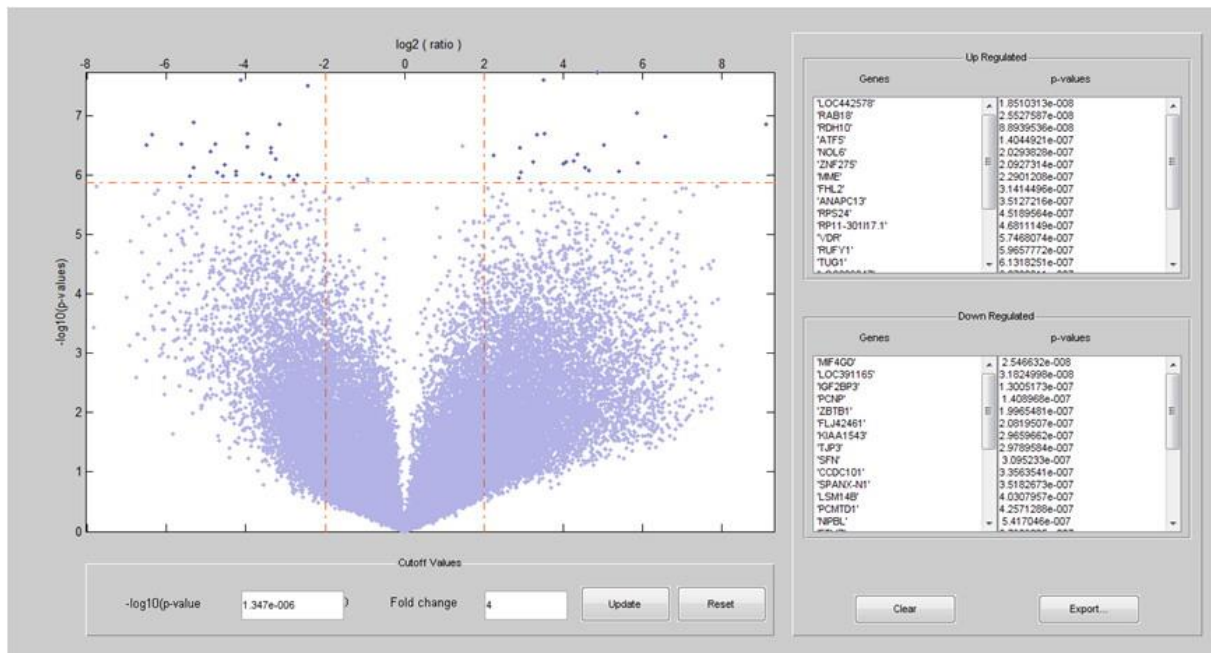


Figura 14: Figura representativa da interface do “Volcano-plot” da plataforma Matlab, mostrando o gráfico de  $\log_2$  (*fold change*) por  $-\log_{10}$  (p-valor). Ao lado direito, o programa fornece uma tabela dos genes superexpressos (*up-regulated*) e subexpressos (*down-regulated*) e seus p-valores respectivos.

Os genes com *fold-change* maior que 2 e p-valor  $< 0.05$  foram então submetidos à análise pelo programa Onto Express, que relaciona os genes diferencialmente expressos à processos biológicos, de acordo com o registro de “GO-terms”. As Tabelas 15 e 16 mostram os resultados dos genes diferencialmente expressos em MACL-1 e MGSO-3,

respectivamente, em relação às células normais, que apresentaram representatividade maior que 1% dentre os processos biológicos.

Tabela 15: Categorias funcionais (processos biológicos) mais representativos nos genes diferencialmente expressos (DE) nas células de linhagem MACL-1.

<b>Processo biológico</b>	<b>DE</b>	<b>% DE total</b>	<b>% genes totais</b>
função desconhecida	3742	23,6	8,3
regulação da transcrição, DNA-dependente	900	5,7	2,0
transcrição	749	4,7	1,7
transdução de sinal	634	4,0	1,4
desenvolvimento de organismo multicelular	439	2,8	1,0
processo biológico	317	2,0	0,7
oxidação/redução	287	1,8	0,6
processo metabólico	261	1,6	0,6
transporte	259	1,6	0,6
adesão celular	255	1,6	0,6
fosforilação proteína/aminoácido	253	1,6	0,6
diferenciação celular	231	1,5	0,5
proteólise	225	1,4	0,5
apoptose	221	1,4	0,5
ciclo celular	220	1,4	0,5
transporte de proteína	214	1,3	0,5
transporte de íon	212	1,3	0,5
proteólise dependente de modificação	210	1,3	0,5
resposta imune	193	1,2	0,4
via de sinalização de receptor acoplado a proteína G	162	1,0	0,4

Tabela 16: Categorias funcionais (processos biológicos) mais representativos nos genes diferencialmente expressos (DE) nas células de linhagem MGSO-3.

<b>Processo biológico</b>	<b>DE</b>	<b>% DE total</b>	<b>% genes totais</b>
função desconhecida	3773	22,67	8,38
regulação da transcrição, DNA-dependente	943	5,67	2,09
transcrição	774	4,65	1,72
transdução de sinal	661	3,97	1,47
desenvolvimento de organismo multicelular	438	2,63	0,97
processo biológico	318	1,91	0,71
oxidação/redução	291	1,75	0,65
transporte	265	1,59	0,59
adesão celular	263	1,58	0,58
processo metabólico	260	1,56	0,58
fosforilação proteína/aminoácido	247	1,48	0,55
ciclo celular	242	1,45	0,54
proteólise	233	1,40	0,52
transporte de íon	232	1,39	0,52
transporte de proteína	229	1,38	0,51
diferenciação celular	224	1,35	0,50
proteólise dependente de modificação	222	1,33	0,49
apoptose	209	1,26	0,46
resposta imune	180	1,08	0,40

A avaliação dos genes diferencialmente expressos nas células da linhagem MACL-1 irradiada em relação às células da linhagem MACL-1 não-tratada também foi realizada. Entretanto, durante o microarranjo, uma replicata de MACL-1 irradiada não apresentou hibridização adequada e por isso foi desconsiderada, restando apenas uma duplicata dessa condição, impossibilitando a inclusão da análise estatística. Ainda assim, os genes resultantes da análise foram submetidos a classificação pelo OntoExpress, como mostrado na Tabela 17.

Tabela 17: Categorias funcionais (processos biológicos) mais representativos nos genes diferencialmente expressos (DE) nas células da linhagem MACL-1, submetida à irradiação em comparação com células da linhagem MACL-1 não-tratadas.

<b>Processo biológico</b>	<b>DE</b>	<b>% DE total</b>	<b>% genes totais</b>
função desconhecida	103	8,41	0,22
regulação da transcrição DNA-dependente	31	2,53	0,07
transdução de sinal	29	2,37	0,06
Transcrição	28	2,29	0,06
desenvolvimento de organismo multicelular	22	1,80	0,05
processo metabólico	14	1,14	0,03
Transporte	13	1,06	0,03

#### **4.5. Microarranjo *versus* imuno-histoquímica**

A lâmina de microarranjo, por abranger vários transcritos humanos, continha os genes das proteínas avaliadas por imuno-histoquímica. O nível de expressão gênica dessas proteínas variou no microarranjo, como é possível ver nas Tabelas 18 e 19, que mostra a faixa de *fold-change* e *p-valor* observada para cada gene (já que um gene às vezes é representado mais de uma vez na lâmina de microarranjo).

Tabela 18: Valores aproximados de *fold-change* observados no microarranjo de cDNA, dos genes das proteínas avaliadas no experimento de imuno-histoquímica, nas células MACL-1.

Proteína	MACL-1	
	<i>fold-change</i>	p-valor
RE (ESR1)	3-4	0.008-0.0075
RP (PGR)	-3	0.04-0.006
HER2 (ERBB2)	6	0.0001
Ki-67	SD*	-
EGFR	5,76 – 13- 86	0.03- 0.0024
Ck5 (KRT5)	-7 - -16	0.03 – 0.0003
CD44	18 – 34	0.001-0.005
CD24	-97	5,00E-06
CD133 (PROM1)	SD*	-

\*SD: sem diferença com o controle.

Tabela 19: Valores aproximados de *fold-change* observados no microarranjo de cDNA, dos genes das proteínas avaliadas no experimento de imuno-histoquímica, nas células MGSO-3.

Proteína	MGSO-3	
	<i>fold-change</i>	p-valor
RE (ESR1)	4-5	0.001-0.01
RP (PGR)	SD*	-
HER2 (ERBB2)	2-3	0.0006-0.02
Ki-67	SD*	-
EGFR	5 - 114	0.03 - 5,43E-06
Ck5 (KRT5)	-6 - -14	0.01 – 0.003
CD44	19 – 36	0.0002 – 0.006
CD24	-135	2,82E-06
CD133 (PROM1)	SD*	-

\*SD: sem diferença com o controle.

#### 4.6. PCR em tempo real

Para avaliar o nível de expressão gênica de alguns genes que se mostraram diferencialmente expressos nos dados de microarranjo utilizamos a técnica de PCR em tempo real. Para isso escolhemos sete genes de interesse: *ATF5*, *B4GALT1*, *CAST*, *LARP1*, *RDH10*, *SFN* e *VDR*.

Como amostras utilizamos *pools* de três diferentes amostras de cDNA, obtidas de diferentes extrações de RNA das células MACL-1 e MGSO-3. Amostras de cDNA de MACL-1 e MGSO-3 utilizadas no microarranjo foram contempladas nos respectivos *pools*.

Como material normalizador, além do cDNA de mama normal utilizado no microarranjo (denominado PEL), utilizamos mais três cDNAs de indivíduos distintos (AB, CN e DIO), a fim de substanciar os resultados com outras amostras normais. Nestas amostras de mama normal, não foi realizado o *pool*, para que o nível de expressão gênica pudesse ser observado em comparação com cada indivíduo.

A Tabela 20 mostra os valores de *fold-change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) dos genes de interesse em relação a dois genes constitutivos (*TBP* e *HPRT*), normalizados com as quatro diferentes amostras de mama normal (AB, CN, DIO e PEL).



Tabela 20: Sumário dos dados de *fold-change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) dos genes de interesse.

Linhagem celular vs. célula normal	<b>ATF5</b>		<b>B4GALT1</b>		<b>CAST</b>		<b>LARP1</b>		<b>RDH10</b>		<b>SFN</b>		<b>VDR</b>	
	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>	<b>TBP</b>	<b>HPRT</b>
<b>MACL-1 vs. AB</b>	0	0	4,08	0,11	0,00	0,00	7,03	0,04	0,00	0	3,72	0,1	1,17	0,05
<b>MACL-1 vs. CN</b>	0,01	0	3,42	0,11	0,00	0,00	8,05	0,04	0,00	0	0,02	0	1,1	0,04
<b>MACL-1 vs. DIO</b>	0,01	0	0,47	0,02	N/A*	N/A	10,16	0,08	0,00	0	0,05	0	0,61	0,04
<b>MACL-1 vs. PEL</b>	0,05	0,01	21,9	2,97	0,00	0,00	10734,7	112,4	0,00	0	0,2	0,03	82,74	6,36
<b>MGSO-3 vs. AB</b>	0	0	0,95	0,05	0,49	0,16	1,53	0,03	0,06	0,01	0,93	0,05	0,11	0,01
<b>MGSO-3 vs. CN</b>	0	0	0,8	0,05	0,25	0,16	1,75	0,03	0,06	0,02	0,01	0	0,1	0,01
<b>MGSO-3 vs. DIO</b>	0	0	0,11	0,01	N/A	N/A	2,21	0,06	0,27	0,01	0,01	0	0,05	0,01
<b>MGSO-3 vs. PEL</b>	0,01	0	5,12	1,31	0,17	0,41	2334,2	75,93	0,06	0,1	0,05	0,01	7,42	0,97

\*N/A: não avaliado.

Para avaliar se o *fold-change* obtido era estatisticamente significativo utilizamos o One-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e considerando  $p < 0.05$ . O resultado da análise estatística pode ser observado na Tabela 21.

Tabela 21: Resultado da análise estatística dos dados de *fold-change* utilizando One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). O valor negativo (sinal “-”) representa subexpressão do gene em relação à amostra normalizadora. O valor positivo (sinal “+”) representa superexpressão do gene em relação à amostra normalizadora. Quando a amostra não teve diferença estatística em relação à amostra normalizadora, o dado está apresentado como não significativo (N/S). N/A representa uma condição não avaliada.

Linhagem celular vs. célula normal	<i>ATF5</i>		<i>B4GALT1</i>		<i>CAST</i>		<i>LARP1</i>		<i>RDH10</i>		<i>SFN</i>		<i>VDR</i>	
	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>
<b>MACL-1 vs. AB</b>	-	-	+	-	N/S	-	+	-	-	-	+	-	N/S	-
<b>MACL-1 vs. CN</b>	-	-	+	-	N/S	-	+	-	-	-	-	-	N/S	-
<b>MACL-1 vs. DIO</b>	-	-	N/S	-	N/A	N/A	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>MACL-1 vs. PEL</b>	-	-	+	+	N/S	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<b>MGSO-3 vs. AB</b>	-	-	N/S	-	N/S	-	N/S	-	-	-	N/S	-	-	-
<b>MGSO-3 vs. CN</b>	-	-	N/S	-	N/S	-	N/S	-	-	-	-	-	-	-
<b>MGSO-3 vs. DIO</b>	-	-	-	-	N/A	N/A	N/S	-	-	-	-	-	-	-
<b>MGSO-3 vs. PEL</b>	-	-	N/S	N/S	N/S	-	+	+	-	-	-	-	+	N/S

A comparação dos dados de microarranjo com os dados de PCR em tempo real, a fim de comparar o nível de expressão desses genes pelas diferentes técnicas, é descrita a seguir.

O perfil de expressão de alguns dos genes selecionados apresentou semelhança com os dados apresentados pelo microarranjo de DNA e pela PCR em tempo real. Entretanto, o padrão de expressão de alguns genes, como é o caso de *ATF5* e *RDH10*, mostrou-se divergente nas duas abordagens. Enquanto que no microarranjo os genes *ATF5* e *RDH10* apresentaram superexpressão, a análise por PCR em tempo real mostrou uma subexpressão desses genes, quando normalizados tanto com *TBP* quanto com *HPRT*. Essa subexpressão foi confirmada nas quatro amostras de mama normal (CN, AB, DIO e PEL).

O gene *CAST*, superexpresso no microarranjo, se mostrou subexpresso quando comparado com *HPRT* em três amostras de mama normal (AB, CN e PEL), mas não apresentou diferença estatística com a amostra normalizadora quando se analisou o nível de expressão gênica com *TBP* como endógeno. Os demais genes tiveram variados níveis de expressão gênica, como descrito a seguir.

No microarranjo, o gene *B4GALT1* apresentou superexpressão nas células MACL-1 e MGSO-3. Já pela PCR em tempo real, somente as células MACL-1 apresentaram esse gene superexpresso. Quando analisadas em relação à amostras de mama normal 3 de 4 condições (AB, CN e PEL) apresentaram a superexpressão do gene *B4GALT1* nas células MACL-1 utilizando o gene constitutivo *TBP* como normalizador. Quando utilizado o gene constitutivo *HPRT*, a superexpressão de *B4GALT1* só foi confirmada em MACL-1 comparando-se com a amostra de mama normal utilizada no microarranjo (PEL). Não houve diferença estatística na comparação do nível de expressão de *B4GALT1* das células MACL-1 com uma amostra de mama normal (DIO), tampouco de MGSO-3 com 3 amostras de mama normal (AB, CN e PEL) quando se utilizou *TBP* como endógeno. Também não houve diferença estatística no nível de expressão de *B4GALT1* em MGSO-3 utilizando-se *HPRT* como endógeno na comparação com a amostra de mama normal PEL. Nas demais condições o gene *B4GALT1* se mostrou subexpresso.

A superexpressão do gene *LARP1* foi confirmada em MACL-1 quando se utilizou *TBP* como constitutivo e em comparação a todas as amostras de mama normal. A superexpressão de *LARP1* por MGSO-3, normalizada com *TBP*, apresentou-se somente com a amostra utilizada no microarranjo (PEL) e não apresentou diferença estatística com

nenhuma das outras amostras (AB, CN e DIO). Utilizando-se o gene *HPRT* como constitutivo, as duas linhagens somente apresentaram superexpressão desse gene quando comparadas com a amostra de mama normal do microarranjo (PEL), enquanto que, em relação as outras amostras normais (AB, CN e DIO), o gene *LARP1* se mostrou subexpresso.

O gene *SFN*, subexpresso em ambas linhagens no microarranjo, teve seu nível de expressão confirmado com ambos genes constitutivos e na maioria das condições avaliadas, com exceção de uma amostra de mama normal (AB) utilizando-se o gene *TBP* como endógeno, que apresentou superexpressão desse gene em MACL-1. Além disso, não houve diferença estatística na comparação de MGSO-3 com a amostra de mama normal AB.

O gene *VDR* teve sua superexpressão confirmada por PCR em tempo real nas células MACL-1 e MGSO-3 utilizando-se *TBP* como constitutivo e a amostra de mama normal do microarranjo (PEL). Utilizando o constitutivo *HPRT*, somente a linhagem MACL-1 apresentou superexpressão de *VDR* em comparação com a amostra de mama normal (PEL), enquanto que o nível de expressão de *VDR* por MGSO-3 não apresentou diferença estatística nessa condição. Não houve diferença estatística na comparação de MACL-1 com as amostras de mama normal AB e CN. Nas demais condições o gene *VDR* se mostrou subexpresso.

## **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença grave no mundo todo e ainda são necessários muitos avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento dessa doença. Uma das maiores barreiras para o progresso na área é a grande heterogeneidade clínica e genética do câncer de mama. Grandes progressos foram feitos na área do diagnóstico nas últimas décadas, mas o diagnóstico e tratamento da doença ainda parece se dividir em dois mundos. Em um deles são considerados os principais parâmetros clínicos (idade, status dos linfonodos, tamanho do tumor e grau histológico) e os marcadores patológicos (receptores de estrógeno/progesterona, o status de HER2 e o perfil proliferativo) para predição de prognóstico e seleção de tratamento adequado. Por outro lado, existe um novo mundo em que os cânceres de mama são classificados pela expressão de vários genes, existindo uma tendência para a individualização de cada tumor e paciente.

A mescla dos dados da patologia clássica com o padrão de expressão de genes de diferentes tumores tem se mostrado válida e útil para o tratamento do paciente, através de utilização de “preditores” de expressão gênica comerciais (Prat *et al.*, 2012). O consenso de St Gallen de 2011 aprova o uso de kits como Oncotype DX para alguns tipos de câncer de mama (Gnant *et al.*, 2011; Goldhirsch *et al.*, 2011). Entretanto, esses kits possuem variações estatísticas entre si, e ainda são destinados a um grupo muito restrito de pacientes, que possuem tumores de perfil menos agressivo (Prat *et al.*, 2012).

A partir destes estudos e através de muitos outros em andamento, espera-se que na próxima década melhorias nesses kits ocorram e que haja um aperfeiçoamento e inclusão contínua desses métodos de detecção à prática clínica. Além disso, espera-se que novos marcadores sejam definidos e que a caracterização de novos modelos para o câncer de mama permitam o melhor entendimento da progressão dessa doença.

Em busca de compreender melhor o câncer de mama, esse trabalho propõe a caracterização de duas linhagens de células derivadas de tumores primários, MACL-1 e MGSO-3, através de diferentes técnicas como imuno-histoquímica, cariotipagem por bandeamento cromossômico, aCGH, microarranjos de cDNA e PCR em tempo real. Essa caracterização tem como intenção observar se há mudanças no padrão de expressão de proteínas do tumor primário para as células em cultura, assim como seu comportamento em

camundongos imunodeficientes. Adicionalmente, a caracterização detalhada dessas células em diferentes níveis moleculares permite mapear modificações genômicas e transcricionais que podem ser úteis em estudos futuros.

A utilização da técnica de imuno-histoquímica permitiu o estudo de várias proteínas relevantes para o câncer de mama, em diferentes condições (tumor primário, células em cultura e células injetadas em camundongos imunodeficientes). A escolha das proteínas avaliadas se baseou em sua relevância no câncer de mama e seu aparecimento em diferentes pesquisas na literatura.

O receptor de estrógeno (RE), o receptor de progesterona (RP) e HER-2 (ERBB2) são comumente utilizados na patologia clássica e sua avaliação é recomendada pelo Colégio de Patologistas Americanos e Sociedade Americana de Oncologia Clínica (Wolff *et al.*, 2007; Goldhirsch *et al.*, 2009; Hammond *et al.*, 2010; Goldhirsch *et al.*, 2011). A presença da proteína Ki-67 também é normalmente usada para investigar o nível de proliferação das células do tumor (Dowsett *et al.*, 2011; Goldhirsch *et al.*, 2011).

A fim de investigar a presença de células-tronco tumorais nas amostras avaliou-se a marcação por CD44 (também conhecido como HCAM) e CD24. Vários trabalhos da literatura mostram que o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> está presente em células-tronco tumorais de câncer de mama (Al Hajj *et al.*, 2003; Giatromanolaki *et al.*, 2011; Gangopadhyay *et al.*, 2012; Velasco-Velazquez *et al.*, 2012). Essas células representam uma pequena parcela do tumor e são responsáveis pela iniciação do tumor, possuem multi-resistência a drogas e participam do processo de desenvolvimento de metástase (Morrison *et al.*, 2008). Células com fenótipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> são encontradas em tumores basais (Ricardo *et al.*, 2011) que não respondem adequadamente à quimioterapia (Giatromanolaki *et al.*, 2011) e também em tumores luminais com mau prognóstico (Tsang *et al.*, 2012).

O anticorpo CD133 também foi utilizado por ter relação com células-tronco tumorais, descrita para vários tipos de câncer (Wu & Wu, 2009; Gangopadhyay *et al.*, 2012). CD133 está relacionado a células tronco tumorais de câncer de mama triplo-negativos (Liu *et al.*, 2012) e também a tumores causados por mutações em BRCA1 (Wright *et al.*, 2008).

A citoqueratina 5 (Ck5) foi avaliada já que estudos anteriores mostram a relação dessa proteína com o fenótipo molecular basal (Sorlie *et al.*, 2001; Abd El-Rehim *et al.*, 2004; Rakha *et al.*, 2007) e a um prognóstico ruim (van de Rijn *et al.*, 2002; Gusterson *et al.*, 2005).

O receptor de EGF (EGFR) também foi avaliado por imuno-histoquímica. Esse marcador foi escolhido porque o EGFR é expresso em tumores triplo-negativos e está associado a um prognóstico ruim (Nielsen *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2012).

Um painel de anticorpos com esses marcadores foi montado e para cada tumor primário obtivemos resultados diferentes. O perfil fenotípico apresentado pelo tumor da Paciente 1 é do subtipo luminal A (RE positivo, RP positivo, HER2 negativo, baixo Ki-67). Esse perfil fenotípico de tumor é característico de tumores menos agressivos e de bom prognóstico (Sorlie *et al.*, 2001). Já o tumor da Paciente 2 apresentou um perfil de subtipo HER2 (RE negativo, RP negativo, HER2 positivo e alto Ki-67). O subtipo HER2 possui prognóstico pior e é característico de tumores mais agressivos (Sorlie *et al.*, 2001).

Além dessas marcações, o tumor da Paciente 2 também apresentou marcação para a proteína CD24. CD24 é uma molécula de adesão semelhante a mucina expressa em múltiplos estágios do desenvolvimento de células B. Em tumores, CD24 aumenta o potencial metastático pois é um ligante de P-selectina, um receptor de adesão em células endoteliais e plaquetas (Lim, 2005) e é um indicador prognóstico ruim de sobrevivência em pacientes com câncer de mama (Baumann *et al.*, 2005). A princípio as observações de Al Hajj e colaboradores (2003), que demonstraram um enriquecimento de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em células-tronco tumorais, parecem contraditórias com o papel metastático de CD24. Entretanto, o processo de metástase é biologicamente diferente do crescimento de um novo tumor a partir de células-tronco, dessa forma justificando a presença ou ausência de CD24 em diferentes estágios da adaptação tumoral (Kristiansen *et al.*, 2004).

A presença de CD24 no tumor primário da Paciente 2 pode indicar que esse carcinoma, apesar de não-infiltrativo, se encontrava em adaptação tumoral para um fenótipo mais agressivo e invasor, condizente com sua classificação de sub-tipo HER2.

O perfil imunohistoquímico tanto das células em cultura quanto do tumor em camundongo Nude demonstrou relevante grau mitótico, mas ausência de marcação para os demais anticorpos. O estabelecimento de células derivadas de um tumor primário é um evento raro, ocorrendo em somente cerca de 1% dos casos (O'Hare, 1991) e muito provavelmente exige a seleção de um fenótipo de "estabelecimento" *in vitro* (Kim *et al.*, 2004). A perda da marcação dos anticorpos inicialmente presentes no tumor primário pode indicar que as células perderam a expressão para os marcadores estudados, mantendo alto



grau proliferativo, mas não os marcadores protéicos observados no tumor primário. Desse modo, as células MACL-1 e MGSO-3 podem ter sofrido mudanças no seu perfil de expressão, a fim de se adaptarem melhor às condições de cultura celular. Mudanças no perfil de expressão de marcadores em linhagens celulares, presentes originalmente no tumor primário que deu origem às células, foram descritas em câncer de mama (Larramendy *et al.*, 2000; Brozova *et al.*, 2007) e em glioblastoma por Strojnik e colaboradores (Strojnik *et al.*, 2010). Além disso, diferenças no perfil de aCGH em câncer de mama (Tsuji *et al.*, 2010) e padrões de metilação de diferentes tipos de câncer (Smiraglia *et al.*, 2001) também foram reportadas em estudos comparativos entre linhagens celulares e seus respectivos tumores primários.

Também é notável o sucesso do transplante das células MACL-1 e MGSO-3 em camundongos Nude, uma vez que somente uma média de 7-20% desses transplantes é bem sucedida (Kim *et al.*, 2004). Dessa maneira, a aplicação de implantes de células de isolados clínicos como MACL-1 e MGSO-3 fornece ferramentas únicas para investigar, *in vivo*, a aplicação de novos produtos terapêuticos e permite estudos de invasão local e interação com o estroma (Vargo-Gogola & Rosen, 2007).

Continuando a caracterização dessas linhagens celulares, procedeu-se para a avaliação genômica dessas células através da cariotipagem. Os resultados de cariotipagem das células MACL-1 e MGSO-3 feitas pelo Laboratório NUPAD e o Laboratório Neogene mostraram resultados semelhantes.

As análises citogenéticas demonstraram mudanças numéricas e estruturais complexas nos cromossomos das células MACL-1 e MGSO-3, evidenciando que, durante a adaptação tumoral, as linhagens estudadas sofreram extensos rearranjos cromossômicos.

No câncer, alterações no número de cópias genômicas podem levar à expressão alterada de múltiplos genes que, em conjunto, contribuem para a desregulação de processos variados que envolvem a estabilidade genômica, levando a ciclos de divisão celular mais propensos a erros (Fridlyand *et al.*, 2006). Portanto, durante a adaptação tumoral, a aneuploidia e a instabilidade genômica podem aumentar a velocidade pela qual as células adquirem mutações necessárias para sua sobrevivência e proliferação. Uma vez adquiridas, essas adaptações podem contribuir para o potencial proliferativo cada vez maior, mesmo na presença da instabilidade genômica (Holland & Cleveland, 2009). Isso parece se aplicar as

células das linhagens de câncer MACL-1 e MGSO-3 que, apesar de possuírem poucos cromossomos intactos, demonstram grande capacidade proliferativa e adaptativa em cultura.

Diversos artigos mostram que alterações cromossômicas estão presentes em linhagens celulares de câncer de mama. A célula mais frequentemente utilizada como modelo de linhagem de câncer de mama, MCF-7, possui inúmeras alterações cromossômicas e transcricionais descritas na literatura há décadas (Seibert *et al.*, 1983; Whang-Peng *et al.*, 1983; Osborne *et al.*, 1987). Além disso, há diferenças genômicas entre variantes de células MCF-7 utilizadas em diferentes laboratórios e centros de pesquisa (Osborne *et al.*, 1987; Nugoli *et al.*, 2003). Juntamente com MCF-7, 18 linhagens de câncer de mama foram estudadas por Davidson e colaboradores (Davidson *et al.*, 2000), através das técnicas de aCGH e SKY (*spectral karyotyping*). Esse trabalho mostra que esses modelos celulares também apresentam várias alterações numéricas e estruturais em seus cromossomos, evidenciando que os achados de MACL-1 e MGSO-3 não são incomuns.

De forma positiva, o mapeamento e documentação dessas modificações, atribuídas a diferentes tipos de celulares, permite a criação de um “banco” de células com diferentes alterações genéticas e cromossomais, que podem ser usadas para finalidades de pesquisa distintas (Larramendy *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000), como a comparação com tumores sólidos que apresentem as mesmas alterações (Tan & Reis-Filho, 2008). Além disso, a rápida capacidade de sofrerem mudanças genéticas fazem dessas células modelos interessantes para o estudo da evolução genética de tumores de mama (Nugoli *et al.*, 2003).

As extensas alterações cromossômicas que essas células apresentam, aliada à dificuldade de identificação dos cromossomos, impulsionaram a realização do experimento de aCGH, que prontamente confirmou que essas células possuem grandes alterações cromossômicas, explicando os resultados encontrados na cariotipagem.

As células MACL-1 e MGSO-3 apresentaram várias alterações no número de cópias (CNAs), mas principalmente exibiram perdas quando considerou-se as duas replicatas de *dye swap* e valor de  $p < 0.05$  (31 CNAs em MACL-1 e 33 CNAs em MGSO-3). Alguns cromossomos apresentaram perdas semelhantes nessas células como os cromossomos 17, 19 e 22.

As linhagens MACL-1 e MGSO-3 apresentaram perda significativa da região 17q21.31. Perdas nessa região foram associadas ao câncer de próstata, em uma frequência maior que

20% nas amostras analisadas no estudo de Kim e colaboradores (Kim *et al.*, 2007). A perda de toda essa região também é descrita para a linhagem celular de adenocarcinoma de próstata PC3 (Clark *et al.*, 2003).

Outra alteração importante refere-se a perda da região 17q12-q21.2, onde está localizada a sequência do gene HER2 (ERBB2), cujo segmento no cromossomo 17 vai de 37844393 a 37884915 bp. A perda dessa região poderia explicar a perda de expressão da proteína HER2 nas células de MGSO-3 e também nos tumores implantados em camundongos Nude.

Perdas no cromossomo 19, especificamente nas regiões 19q13.33-13.43 foram encontradas de forma significativa somente na linhagem MGSO-3. Perdas nessa região não são comuns, mas já foram descritas em câncer de ovário e gliomas (Mora *et al.*, 2001; Barbashina *et al.*, 2005). A perda de heterozigidade nesses tumores sugere que essa região possui um gene supressor de tumor, mas tentativas para descobrir qual seria esse gene foram frustradas (Chou *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2001).

Perdas no braço longo do cromossomo 22 são frequentemente observados em carcinomas de mama (Iida *et al.*, 1998). Outros trabalhos reportam que a perda de 22q é comum neste tipo de câncer, sendo relatadas frequências entre 11 a 66% (Sato *et al.*, 1990; Bieche & Lidereau, 1995; Allione *et al.*, 1998). Estudos anteriores reportaram a perda de vários alelos nessa região em cânceres de mama esporádicos, mas o possível gene supressor de tumor nessa região ainda não foi identificado (Benetkiewicz *et al.*, 2006). Um gene de destaque dessa região é *SMARCB1*, também conhecido como *IN1*. Ele é relatado como um gene supressor de tumor e foi primeiramente descrito em um tumor rabdóide infantil e posteriormente descrito em carcinomas medulares renais, sarcomas, carcinomas mioepiteliais e condrosarcomas (Hollmann & Hornick, 2011)

De forma geral, os processos biológicos das alterações de MAEL-1 e MGSO-3 mostraram genes envolvidos em várias atividades, como transcrição de genes, regulação do ciclo celular e processos metabólicos. Não há uma tendência específica por nenhum processo metabólico.

Os dados de microarranjo confirmaram que várias vias de sinalização podem estar alteradas nessas células. Os processos biológicos relacionados nas Tabelas 15 e 16 mostram alterações em genes que participam na transcrição gênica e sua regulação, ciclo celular,

transdução de sinais e processos metabólicos, por exemplo. Alterações nessas características são adquiridas pelas células tumorais durante a adaptação tumoral, tornando-se cumulativas e criando uma rede de interações complexas e imprevisíveis, diferentes das encontradas na célula normal (Hanahan & Weinberg, 2011). A análise mais acurada de quais genes foram diferencialmente expressos em MACL-1 e MGSO-3 pode indicar outros genes importantes para a adaptação tumoral no câncer de mama, ainda não estudados na literatura.

Apesar dos processos biológicos da Tabela 17 permanecerem os mesmos que os das tabelas 15 e 16, uma análise mais aprofundada dos resultados gerados na comparação de MACL-1 não tratada com MACL-1 irradiada é necessária, a fim de averiguar quais genes foram ativados ou reprimidos especificamente, além de co-relacionar esses genes com a resistência à irradiação. Além disso, será necessário considerar a análise de acordo com a dose e o tempo de incubação das células após a irradiação, uma vez que diferentes genes e proteínas têm sua expressão regulada de acordo com a dose e período de tempo de coleta dos RNAs mensageiros após a irradiação (Sreekumar *et al.*, 2001; Otomo *et al.*, 2004).

Com o resultado do microarranjo, também foi possível averiguar o nível de expressão gênica dos marcadores utilizados na imuno-histoquímica. Como é possível observar nas Tabelas 18 e 19, alguns dados do microarranjo se mostraram discrepantes ao observado na imuno-histoquímica. Esperava-se, por exemplo, que o gene Ki-67 estivesse superexpresso nas células MACL-1, pois foi observada alta expressão dessa proteína na imuno-histoquímica. Porém, o resultado do microarranjo mostra que não há variação do nível de expressão desse gene em relação à amostra de mama normal. A proteína CD44, por exemplo, poderia ter se mostrado expressa na imuno-histoquímica se considerássemos somente o resultado do microarranjo. Entretanto, o nível de expressão gênica depende de muitos fatores, inclusive pós-transcricionais, o que poderia explicar a divergência dos resultados. Além disso, o p-valor observado para alguns genes não é tão baixo, necessitando-se de experimentos de PCR em tempo real ou Western-blot para que seja confirmado o nível de expressão.

Como o microarranjo demonstrou a expressão diferenciada de muitos genes distintos, que participam de várias vias de sinalização, procedeu-se para a escolha de genes candidatos de interesse para estudos *in vitro* e *in vivo* posteriores. Uma pesquisa na literatura foi realizada para aqueles genes que possuíam comportamento alterado no

câncer, especialmente no câncer de mama. Também foi considerado o *fold-change* desses genes bem como o valor de p pelo teste t de Student.

Os genes candidatos foram escolhidos segundo sua relevância para o câncer e seu potencial uso em trabalhos futuros. Os genes escolhidos foram *ATF5*, *B4GALT1*, *CAST*, *LARP1*, *RDH10*, *SFN* e *VDR*.

O fator de transcrição *ATF5* é um membro da família CREB (*ATF/cAMP-response element-binding protein*) e possui um papel crítico na diferenciação de células neuronais e apoptose (Wei *et al.*, 2008). Em relação à sua participação no câncer, é relatado que o *ATF5* interage com a proteína anti-apoptótica BCL-2, levando à sobrevivência de células de glioma C6 e células de câncer de mama MCF-7 (Dluzen *et al.*, 2011).

*B4GALT1* é um dos sete genes da família de beta-1,4-galactosiltransferases. Esses genes codificam glicoproteínas ligadas à membrana do tipo II, tendo especificidade pelo substrato UDP-galactose. Várias linhas de evidência recentes demonstram que há alterações epigenéticas em galactosiltransferases em células tumorais em relação ao tecido normal (Poeta *et al.*, 2012; Caretti *et al.*, 2012). Além disso, também foi relatada a participação de *B4GALT1* na adesão de células MDA-MB-231 à laminina (Villegas-Comonfort *et al.*, 2012).

A calpastatina, ou *CAST*, é um inibidor endógeno da calpaína, uma cisteíno-protease dependente de cálcio. A desregulação da interação entre calpaína/calpastatina pode levar a distrofia muscular, Alzheimer, injúria neurológica, aterosclerose, diabetes, catarata e câncer (Carragher, 2006). A calpaína também está relacionada a processos de morte celular como necrose e apoptose, nesse último contribuindo para amplificar o sinal de morte celular da caspase 3 (Wang, 2000). Além disso, as isoformas de calpaína dependem de níveis diferentes de cálcio intracelular para sua ação (Molinari, Carafoli, 1997; Wang, 2000; Todd *et al.*, 2003). Esses dados demonstram que a calpastatina poderia regular a apoptose e os níveis de cálcio nas células tumorais através da inibição da calpaína.

A proteína ligadora a RNA *LARP1* está envolvida na espermatogênese, embriogênese e progressão do ciclo celular em *Drosophila* (Ichihara *et al.*, 2007; Blagden *et al.*, 2009). A redução na expressão de *LARP1* por siRNA em células HeLa inibiu a síntese global de proteínas, resultando em parada no ciclo mitótico e metáfase aberrante, levando à apoptose (Burrows *et al.*, 2010). Além disso, a inibição da expressão dessa proteína levou a uma redução na migração das células e foi demonstrado que essa proteína está ligada

diretamente a componentes do citoesqueleto (Burrows *et al.*, 2010). Desse modo, *LARP1* é requerida para mitose ordenada, sobrevivência e migração celular e foi recentemente avaliada em estudos de subexpressão de miR-9 em câncer de mama (Selcuklu *et al.*, 2012).

O gene *RDH10* codifica uma retinol desidrogenase, que converte *all-trans* retinol para *all-trans* retinal, com NADP como cofator. Os relatos da literatura correlacionam a subexpressão de retinol desidrogenases com adenoma e carcinoma do cólon intestinal (Jette *et al.*, 2004) e a super-expressão de *RDH10* à parada do crescimento de células HepG2 (Rossi *et al.*, 2007).

O gene *SFN* é comumente conhecido na literatura como 14-3-3sigma (ou 14-3-3 $\sigma$ ). Proteínas 14-3-3 são cruciais na progressão do ciclo celular, controle do dano ao DNA e apoptose. A isoforma sigma é um gene responsivo a p53, cuja função está frequentemente perdida em tumores humanos, incluindo os de mama (Wilker *et al.*, 2007). A perda da proteína 14-3-3sigma não ocorre somente no tumor em si, mas também no tecido pré-displásico ao redor, indicando sua possível função como gene supressor de tumor (Umbricht *et al.*, 2001). O trabalho de Wilker e colaboradores (Wilker *et al.*, 2007) demonstrou que a subexpressão de 14-3-3sigma impede a saída das células da mitose, gerando células binucleadas, podendo levar a aneuploidia e instabilidade genômica. Ferguson e colaboradores também demonstraram que a perda de expressão de *SFN* por hipermetilação de sua região gênica pode parar as células na fase G2 do ciclo celular, permitindo o acúmulo de defeitos genéticos (Ferguson *et al.*, 2000; Umbricht *et al.*, 2001). É relatado também que esse gene é subregulado em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2012) e que sua subexpressão por hipermetilação ocorre em vários tipos de câncer (Suzuki *et al.*, 2000).

O gene *VDR* codifica o receptor nuclear hormonal da vitamina D (*VDR*) e está relacionado ao metabolismo de minerais, resposta imune e ao câncer. A vitamina D possui funções antiproliferativas e pró-diferenciadoras em vários tecidos epiteliais, incluindo a glândula mamária (Deeb *et al.*, 2007), sendo candidata à terapia para o câncer. Entretanto, células de câncer de mama podem apresentar o receptor de vitamina D não responsivo ao tratamento à essa vitamina. Esse efeito foi principalmente estudado em células MCF-7 (Colston & Welsh, 2004). Além disso, camundongos *knockout* para *VDR* apresentam maior

incidência de lesões de mama induzidas por carcinógenos comparados com camundongos normais (Zinser *et al.*, 2005).

Cada um desses genes apresentou um comportamento de expressão gênica diferente quando comparado à diferentes células de mama normal. Os genes *ATF5*, *RDH10* e *CAST* apresentaram superexpressão no microarranjo, enquanto que na PCR em tempo real, apresentaram subexpressão. Já era esperado que nem todos os genes que possuíam diferença de expressão gênica pelo microarranjo apresentassem a mesma diferença de expressão gênica por PCR em tempo real. Isso se deve ao fato de que a expressão gênica diferenciada de determinados genes pode representar um estado temporário daquelas células, devido à uma necessidade passageira ou devido à alguma pequena alteração nas condições de cultura celular. Além disso, as células podem apresentar diferentes níveis de expressão gênica devido ao estágio de divisão celular no qual se encontram. Desse modo, não é surpreendente que alguns genes candidatos não tenha sua expressão confirmada por outra técnica.

Além disso, para alguns genes e algumas condições, observou-se que o nível de expressão gênica foi validado somente com a amostra de mama normal utilizada no microarranjo, denominada PEL. Essa situação ocorreu para o gene *VDR* por exemplo. Esse resultado também era esperado, já que no microarranjo foi utilizada somente uma amostra de mama normal, devido à indisponibilidade local de mais amostras de mama normal para extração celular. As outras amostras de mama normal, AB, CN e DIO então, foram acrescentadas ao experimento de PCR em tempo real, visando minimizar falso-negativos devido ao uso de somente uma amostra de mama normal no microarranjo.

De fato, vários genes tiveram o nível de expressão gênica validado com outras amostras de mama normal. É o caso de *B4GALT1* em MACL-1 quando se utilizou o gene *TBP* como normalizador ou de *SFN* em MACL-1 e MGSO-3 quando se utilizou esse mesmo gene constitutivo.

Após análise por microarranjo e PCR em tempo real, visualizamos que os genes *B4GALT1* e *SFN* são bons candidatos para experimentos futuros, devido à confirmação do nível de expressão desses genes por duas técnicas e em outros controles de mama normal.

## **CONCLUSÕES**



## 6. CONCLUSÕES

- Houve alterações do perfil proteico do tumor primário em relação às células em cultura e implantes de tumor derivados das células em camundongos imunodeficientes.
- As células MACL-1 e MGSO-3 sofreram seleção por um fenótipo mais adaptado às condições de cultura celular.
- As linhagens MACL-1 e MGSO-3 são hipodiplóides e possuem grandes alterações numéricas e estruturais em seus cromossomos. Apesar de apresentar evidências de instabilidade genômica, essas linhagens mantêm alto potencial proliferativo.
- A análise da expressão gênica demonstrou alterações em diferentes vias de sinalização e a PCR em tempo real confirmou o nível de expressão de alguns genes avaliados no microarranjo.
- Não foi possível realizar a comparação de células MACL-1 irradiadas em relação à MACL-1 não irradiada.

## **PERSPECTIVAS**

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de Western-blot para avaliar o nível de expressão de *B4GALT1* e *SFN* nas células em cultura.
- Validar mais genes de interesse através de PCR em tempo real.
- Escolher e validar genes relacionados à irradiação das células MACL-1.
- Validar os genes de interesse, inclusive *B4GALT1* e *SFN*, em amostras de câncer de mama de outros indivíduos.
- Usar as células MACL-1 e MGSO-3 em estudos comparativos com outras linhagens celulares disponíveis.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO. 2004. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 203:661-671.
- Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-3988.
- Allione F, Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H, Birnbaum D. 1998. Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22Q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer* 75:181-186.
- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. 1998. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11:155-168.
- Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. 2010. Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol* 28:3366-3379.
- Andre F, McShane LM, Michiels S, Ransohoff DF, Altman DG, Reis-Filho JS, Hayes DF, Puztai L. 2011. Biomarker studies: a call for a comprehensive biomarker study registry. *Nat Rev Clin Oncol* 8:171-176.
- Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. 2005. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 11:1119-1128.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. 2003. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21:1973-1979.
- Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. 2005. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 65:10783-10793.
- Benetkiewicz M, Piotrowski A, Diaz dS, Jankowski M, Bala D, Hoffman J, Srutek E, Laskowski R, Zegarski W, Dumanski JP. 2006. Chromosome 22 array-CGH profiling of breast cancer delimited minimal common regions of genomic imbalances and revealed frequent intratumoral genetic heterogeneity. *Int J Oncol* 29:935-945.
- Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, Borresen-Dale AL, Pollack JR. 2006. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45:1033-1040.

- Bertollo CM, Correa CR, Gomes DA, Souza-Fagundes EM, Goes AM. 2010. Effect of radiation treatment on newly established human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3. *Tumour Biol* 31:189-197.
- Bieche I, Lidereau R. 1995. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 14:227-251.
- Blagden SP, Gatt MK, Archambault V, Lada K, Ichihara K, Lilley KS, Inoue YH, Glover DM. 2009. Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Dev Biol* 334:186-197.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185-193.
- Brozova M, Kleibl Z, Netikova I, Sevcik J, Scholzova E, Brezinova J, Chaloupkova A, Vesely P, Dundr P, Zadinova M, Krasna L, Matouskova E. 2007. Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *Breast Cancer Res Treat* 103:247-257.
- Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res* 5:89-95.
- Burrows C, Abd LN, Lam SJ, Carpenter L, Sawicka K, Tzolovsky G, Gabra H, Bushell M, Glover DM, Willis AE, Blagden SP. 2010. The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic Acids Res* 38:5542-5553.
- Callagy G, Pharoah P, Chin SF, Sangan T, Daigo Y, Jackson L, Caldas C. 2005. Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays. *J Pathol* 205:388-396.
- Caretti A, Sirchia SM, Tabano S, Zulueta A, Dall'Olio F, Trinchera M. 2012. DNA methylation and histone modifications modulate the beta1,3 galactosyltransferase beta3Gal-T5 native promoter in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44:84-90.
- Carragher NO. 2006. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des* 12:615-638.
- Chou D, Miyashita T, Mohrenweiser HW, Ueki K, Kastury K, Druck T, von Deimling A, Huebner K, Reed JC, Louis DN. 1996. The BAX gene maps to the glioma candidate region at 19q13.3, but is not altered in human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 88:136-140.
- Clark J, Edwards S, Feber A, Flohr P, John M, Giddings I, Crossland S, Stratton MR, Wooster R, Campbell C, Cooper CS. 2003. Genome-wide screening for complete genetic loss in prostate cancer by comparative hybridization onto cDNA microarrays. *Oncogene* 22:1247-1252.
- Correa CR, Bertollo CM, Goes AM. 2009. Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncol Res* 17:473-482.

Correa CR, Bertollo CM, Zouain CS, Goes AM. 2010. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a surface associated antigen on human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3. *Oncol Rep* 24:677-685.

Cui X, Churchill GA. 2003. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 4:210.

Davidson JM, Gorringer KL, Chin SF, Orsetti B, Besret C, Courtoy-Cahen C, Roberts I, Theillet C, Caldas C, Edwards PA. 2000. Molecular cytogenetic analysis of breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 83:1309-1317.

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7:684-700.

Dluzen D, Li G, Tacelosky D, Moreau M, Liu DX. 2011. BCL-2 is a downstream target of ATF5 that mediates the prosurvival function of ATF5 in a cell type-dependent manner. *J Biol Chem* 286:7705-7713.

Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF. 2011. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 103:1656-1664.

Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H, Marks JR, Lambers AR, Futreal PA, Stampfer MR, Sukumar S. 2000. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6049-6054.

Foley J, Nickerson NK, Nam S, Allen KT, Gilmore JL, Nephew KP, Riese DJ. 2010. EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone. *Semin Cell Dev Biol* 21:951-960.

Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Olshen A, Se Graves R, Dairkee S, Tokuyasu T, Ljung BM, Jain AN, McLennan J, Ziegler J, Chin K, DeVries S, Feiler H, Gray JW, Waldman F, Pinkel D, Albertson DG. 2006. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6:96.

Gangopadhyay S, Nandy A, Hor P, Mukhopadhyay A. 2012. Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. *Clin Breast Cancer*.

Gerber DE. 2008. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician* 77:311-319.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. 2011. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol* 28:745-752.

Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. 2008. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 49:193-199.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1:555-567.

Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. 2011. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)* 6:136-141.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. 2009. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20:1319-1329.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. 2011. 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. *Ann Oncol* 22:1736-1747.

Guo C, Liu S, Sun MZ. 2012. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor. *Clin Transl Oncol*.

Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. 2005. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:143-148.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 134:e48-e72.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

Harper LJ, Costea DE, Gammon L, Fazil B, Biddle A, Mackenzie IC. 2010. Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. *BMC Cancer* 10:166.

Holland AJ, Cleveland DW. 2009. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:478-487.

Hollmann TJ, Hornick JL. 2011. INI1-deficient tumors: diagnostic features and molecular genetics. *Am J Surg Pathol* 35:e47-e63.

Hudis CA. 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357:39-51.

Ichihara K, Shimizu H, Taguchi O, Yamaguchi M, Inoue YH. 2007. A Drosophila orthologue of larp protein family is required for multiple processes in male meiosis. *Cell Struct Funct* 32:89-100.



Iida A, Kurose K, Isobe R, Akiyama F, Sakamoto G, Yoshimoto M, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M. 1998. Mapping of a new target region of allelic loss to a 2-cM interval at 22q13.1 in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 21:108-112.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidencia de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009, 98p.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011, 118 p.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. 2003a. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31:e15.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. 2003b. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249-264.

Jette C, Peterson PW, Sandoval IT, Manos EJ, Hadley E, Ireland CM, Jones DA. 2004. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J Biol Chem* 279:34397-34405.

Khatri P, Draghici S, Ostermeier GC, Krawetz SA. 2002. Profiling gene expression using onto-express. *Genomics* 79:266-270.

Kim JB, O'Hare MJ, Stein R. 2004. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res* 6:22-30.

Kim JH, Dhanasekaran SM, Mehra R, Tomlins SA, Gu W, Yu J, Kumar-Sinha C, Cao X, Dash A, Wang L, Ghosh D, Shedden K, Montie JE, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM. 2007. Integrative analysis of genomic aberrations associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 67:8229-8239.

Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. 2004. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol* 35:255-262.

Larramendy ML, Lushnikova T, Bjorkqvist AM, Wistuba II, Virmani AK, Shivapurkar N, Gazdar AF, Knuutila S. 2000. Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 119:132-138.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67:1030-1037.

Lim SC. 2005. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2:S351-S354.

Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong XY, Zhao N, Liu N. 2012. CD133(+) cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*.

- Loo LW, Grove DI, Williams EM, Neal CL, Cousens LA, Schubert EL, Holcomb IN, Massa HF, Glogovac J, Li CI, Malone KE, Daling JR, Delrow JJ, Trask BJ, Hsu L, Porter PL. 2004. Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res* 64:8541-8549.
- Lyng MB, Laenholm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. 2008. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* 8:20.
- Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. 2000. The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:139-163.
- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. 2012. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 136:331-345.
- McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. 2007. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol* 8:107.
- Molinari M, Carafoli E. 1997. Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J Membr Biol* 156:1-8.
- Mora J, Cheung NK, Chen L, Qin J, Gerald W. 2001. Loss of heterozygosity at 19q13.3 is associated with locally aggressive neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 7:1358-1361.
- Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. 2008. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 10:210.
- NCI-National Cancer Institute. Breast Cancer: Prevention, Genetics, Causes. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/prevention-genetics-causes/breast>. Acesso em: 20 jan 2013a.
- NCI-National Cancer Institute. Breast Cancer Treatment. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page5>. Acesso em: 20 jan 2013b.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10:515-527.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslén LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de RM, Perou CM. 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367-5374.
- Nugoli M, Chuchana P, Vendrell J, Orsetti B, Ursule L, Nguyen C, Birnbaum D, Douzery EJ, Cohen P, Theillet C. 2003. Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. *BMC Cancer* 3:13.

Obr AE, Edwards DP. 2012. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 357:4-17.

Osborne CK, Hobbs K, Trent JM. 1987. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 9:111-121.

Otomo T, Hishii M, Arai H, Sato K, Sasai K. 2004. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J Radiat Res (Tokyo)* 45:53-60.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27:1160-1167.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.

Poeta ML, Massi E, Parrella P, Pellegrini P, De Robertis M, Copetti M, Rabitti C, Perrone G, Muda AO, Molinari F, Zanellato E, Crippa S, Caputo D, Caricato M, Frattini M, Coppola R, Fazio VM. 2012. Aberrant promoter methylation of beta-1,4 galactosyltransferase 1 as potential cancer-specific biomarker of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*.

Prat A, Ellis MJ, Perou CM. 2012. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol* 9:48-57.

Prat A, Parker JS, Fan C, Cheang MC, Miller LD, Bergh J, Chia SK, Bernard PS, Nielsen TO, Ellis MJ, Carey LA, Perou CM. 2012c. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Ann Oncol* 23:2866-2873.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:973-978.

Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. 2005. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol* 6:520-528.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313:856-862.

Rakha EA, El Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. 2007. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* 50:434-438.

Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. 2006. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 59:225-231.

- Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. 2011. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* 64:937-946.
- Rossi E, Picozzi P, Bodega B, Lavazza C, Carlo-Stella C, Marozzi A, Ginelli E. 2007. Forced expression of RDH10 gene retards growth of HepG2 cells. *Cancer Biol Ther* 6:238-244.
- Sato T, Tanigami A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y. 1990. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 50:7184-7189.
- Salles MA, Matias MARF, Perez AA, Gobbi H. 2006. Carcinoma ductal *in situ* da mama: critérios para diagnóstico e abordagem em hospitais públicos de Belo Horizonte. *Rev Bras Ginecol Obstet* 28: 721-727.
- Seibert K, Shafie SM, Triche TJ, Whang-Peng JJ, O'Brien SJ, Toney JH, Huff KK, Lippman ME. 1983. Clonal variation of MCF-7 breast cancer cells in vitro and in athymic nude mice. *Cancer Res* 43:2223-2239.
- Selcuklu SD, Donoghue MT, Rehmet K, de Souza GM, Fort A, Kovvuru P, Muniyappa MK, Kerin MJ, Enright AJ, Spillane C. 2012. MicroRNA-9 Inhibition of Cell Proliferation and Identification of Novel miR-9 Targets by Transcriptome Profiling in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 287:29516-29528.
- Sidransky D. 2002. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2:210-219.
- Slodkowska EA, Ross JS. 2009. MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn* 9:417-422.
- Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C. 2001. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 10:1413-1419.
- Smith JS, Tachibana I, Pohl U, Lee HK, Thanarajasingam U, Portier BP, Ueki K, Ramaswamy S, Billings SJ, Mohrenweiser HW, Louis DN, Jenkins RB. 2000. A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics* 64:44-50.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein LP, Borresen-Dale AL. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-10874.
- Sobin, L.H.; Gospodarowicz, M. K.; Wittekind, C. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition, Wiley-Blackwell, 336 p., 2009
- Sparano JA, Paik S. 2008. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 26:721-728.

Speirs V, White MC, Green AR. 1996. Collagenase III: a superior enzyme for complete disaggregation and improved viability of normal and malignant human breast tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32:72-74.

Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, Chinnaiyan AM. 2001. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res* 61:7585-7593.

Stein CJ, Colditz GA. 2004. Modifiable risk factors for cancer. *Br J Cancer* 90:299-303.

Strojniak T, Kavalari R, Barone TA, Plunkett RJ. 2010. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. *Anticancer Res* 30:4851-4860.

Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. 2000. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 60:4353-4357.

Tan DS, Reis-Filho JS. 2008. Comparative genomic hybridisation arrays: high-throughput tools to determine targeted therapy in breast cancer. *Pathobiology* 75:63-74.

Todd B, Moore D, Deivanayagam CC, Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, Wang KK, Narayana SV. 2003. A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J Mol Biol* 328:131-146.

Tsang JY, Huang YH, Luo MH, Ni YB, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. 2012. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 136:407-417.

Tsuji K, Kawauchi S, Saito S, Furuya T, Ikemoto K, Nakao M, Yamamoto S, Oka M, Hirano T, Sasaki K. 2010. Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues: comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues. *BMC Cancer* 10:15.

Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. 2001. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* 20:3348-3353.

Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P. 2007. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther* 6:789-801.

van Beers EH, Nederlof PM. 2006. Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Res* 8:210.

van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, Torhorst J, Sauter G, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Seitz R, Ross D, Botstein D, Brown P. 2002. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 161:1991-1996.

- Vargo-Gogola T, Rosen JM. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 7:659-672.
- Velasco-Velazquez MA, Homsí N, De La FM, Pestell RG. 2012. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44:573-577.
- Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Le B, X, Louis H, Boilly B, Nurcombe V, Revillion F, Peyrat JP, Hondermarck H. 2001. Proteomic analysis reveals that 14-3-3sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res* 61:76-80.
- Villegas-Comonfort S, Serna-Marquez N, Galindo-Hernandez O, Navarro-Tito N, Salazar EP. 2012. Arachidonic acid induces an increase of beta-1,4-galactosyltransferase I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Biochem*.
- Wang KK. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23:20-26.
- Wei Y, Jiang J, Liu D, Zhou J, Chen X, Zhang S, Zong H, Yun X, Gu J. 2008. Cdc34-mediated degradation of ATF5 is blocked by cisplatin. *J Biol Chem* 283:18773-18781.
- Weigelt B, Reis-Filho JS. 2010. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Res* 12 Suppl 4:S5.
- Whang-Peng J, Lee EC, Kao-Shan CS, Seibert K, Lippman M. 1983. Cytogenetic studies of human breast cancer lines: MCF-7 and derived variant sublines. *J Natl Cancer Inst* 71:687-695.
- WHO-World Health Organization. Guidelines for management of breast cancer. EMRO Technical Publications Series 31: WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2006, 56 p.
- WHO-World Health Organization. Fact sheet n° 297. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 30 mai 2011.
- Wicha MS, Liu S, Dontu G. 2006. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66:1883-1890.
- Wilker EW, van Vugt MA, Artim SA, Huang PH, Petersen CP, Reinhardt HC, Feng Y, Sharp PA, Sonenberg N, White FM, Yaffe MB. 2007. 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* 446:329-332.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van d, V, Wheeler TM, Hayes DF. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118-145.
- Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. 2008. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+. *Breast Cancer Res* 10:R10.

Wu Y, Wu PY. 2009. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* 18:1127-1134.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. 2010. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11:174-183.

Zheng G, Xiong Y, Yi S, Zhang W, Peng B, Zhang Q, He Z. 2012. 14-3-3sigma regulation by p53 mediates a chemotherapy response to 5-fluorouracil in MCF-7 breast cancer cells via Akt inactivation. *FEBS Lett* 586:163-168.

Zinser GM, Suckow M, Welsh J. 2005. Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:153-164.

## **ANEXO 1**

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP)  
Aprovação Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0312.0.203.000-10

**Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**  
**Instituto de Ciências Biológicas - UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 24 de novembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise da expressão gênica diferencial em linhagens de câncer de mama resistentes à radiação gama**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

### CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Dawidson Assis Gomes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA RESISTENTES À RADIAÇÃO GAMA , submetido a esta comissão pelo protocolo 35, a CEUA decidiu **aprovar** sua solicitação.

Justificativa: Aprovada a resposta à diligência na reunião do dia 28/03/2012

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 30/03/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## **ANEXO 2**

Laudos histopatológicos

# Laudo do tumor que deu origem à linhagem MACL-1

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO



---

Paciente: [REDACTED]  
Clínica Dr(a): [REDACTED] Ent: [REDACTED]  
Procedência: [REDACTED] Admissão: [REDACTED]  
Convênio: [REDACTED] Reg.: [REDACTED]  
Exame: EXAME ANATOMO PATOLOGICO/BIOPSIA  
Material: MAMA ESQUERDA+MARGENS (2)

---

## R E L A T Ó R I O

### RESUMO CLÍNICO:

---

### MACROSCOPIA:

Material recebido em frasco rotulado e constituído por porção de tecido pardo-amarelado pesando 50,0 gramas e medindo 6,0x5,0x2,5 cm, exibindo áreas marcadas com fios ( 04 fios curtos, anterior, 01 fio longo caudal, 04 fios longos, lateral e 02 fios longos).  
Aos cortes observamos lesão brancacenta, firme medindo 2,3 cm de extensão, situada a 1,0 cm da borda anterior (04 fios curtos) e 0,2 cm da borda apostá a está (posterior) pintada em nankin.

### MICROSCOPIA E CONCLUSÃO:

Carcinoma ductal invasor de mama, com atipias nucleares moderadas (2), algumas mitoses (2) e pouca formação de túbulos (3), (grau II de Bloom-Richardson).

Há desmoplasia moderada, escasso infiltrado linfóide e frequentes, microcalcificações.

A lesão situa-se a 2,0 mm da margem posterior.

Belo Horizonte, 04 de maio de 2009

O presente laudo é uma análise interpretativa com aspectos subjetivos dos elementos morfológicos expressos na amostra, sendo consequência de dados clínicos, laboratoriais e morfológicos. Os diagnósticos podem variar na dependência do patologista examinador, dos informes clínicos, das imagens anexas, do emprego de técnicas especiais (ex. imunohistoquímica) e da evolução científica. Quaisquer dúvidas ou discordâncias frente ao laudo devem ser imediatamente comunicadas, postergando-se medidas terapêuticas pois a sensibilidade e especificidade do método histopatológico não são absolutas, podendo requerer revisões de lâminas ou novos cortes para completa elucidação do caso

## Laudo do tumor que deu origem à linhagem MGSO-3

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO



---

Paciente: [REDACTED]  
Clínica Dr(a): [REDACTED] Ent: [REDACTED]  
Procedência: [REDACTED] EXT [REDACTED]  
Convênio: [REDACTED] Admissão: [REDACTED]  
Exame: EXAME ANATOMO PATOLOGICO POR ORGAO, BIOP Reg.: [REDACTED]  
Material: MAMA ESQUERDA

---

### R E L A T Ó R I O

#### RESUMO CLÍNICO:

---

#### MACROSCOPIA:

Material recebido em frasco rotulado e constituído por retalho de pele mamário, medindo 4,5x3,5x1,5 cm.

Aos cortes apresenta lesão nodular e firme em margem inferior, medindo 1,0 cm.

#### MICROSCOPIA:

Cortes histológicos do material mostram tecido fibro-adiposo mamário contendo carcinoma intraductal de alto grau, com focos de necrose central, tipo comedocarcinoma, sem áreas de invasão franca do estroma, na amostra. A lesão alcança as margens.

#### CONCLUSÃO:

Carcinoma intraductal de mama, de alto grau, tipo comedocarcinoma.

Belo Horizonte, 20 de maio de 2009

O presente laudo é uma análise interpretativa com aspectos subjetivos dos elementos morfológicos expressos na amostra, sendo consequência de dados clínicos, laboratoriais e morfológicos. Os diagnósticos podem variar na dependência do patologista examinador, dos informes clínicos, das imagens anexas, do emprego de técnicas especiais (ex. imunohistoquímica) e da evolução científica. Quaisquer dúvidas ou discordâncias frente ao laudo devem ser imediatamente comunicadas, postergando-se medidas terapêuticas pois a sensibilidade e especificidade do método histopatológico não são absolutas, podendo requerer revisões de lâminas ou novos cortes para completa elucidação do caso

## **ANEXO 3**

Laudos citogenéticos

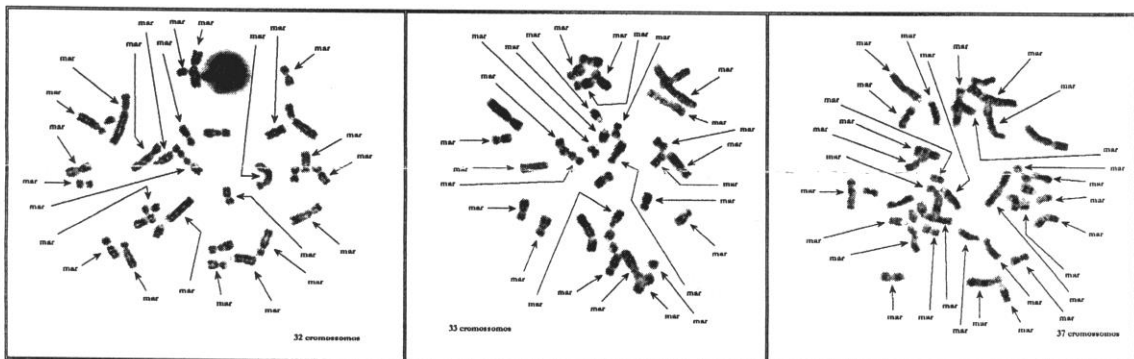


## ESTUDO CITOGENÉTICO

**Material:** Células de câncer de mama MACL-14 em frascos de cultura.

### ANÁLISE

- Número de cromossomo por metáfase: **30 – 37 cromossomos**
- Cromossomos marcadores por metáfase: **22 – 30 cromossomos por metáfase**
- Características morfológicas dos cromossomos marcadores:
  - Metacêntricos grandes
  - Metacêntricos pequenos
  - Acrocêntricos grandes
  - Acrocêntricos pequenos
  - Sub metacêntricos pequenos
- Cromossomos normais encontrados: **2, 12, 14, 15, 16, 17, 21, 22 e X**



### RESULTADO

Todas as metáfases analisadas foram hipodiplóide (30 a 37 cromossomos).  
Em todas as metáfases analisadas a maioria dos cromossomos eram marcadores (22 a 30 cromossomos).

### CONCLUSÃO

Presença de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, representativas de re-arranjos cromossômicos complexos.

Belo Horizonte, 09 de março de 2010

  
Dra. Dora Méndez del Castillo  
CRM - 35197

  
Gená Soares Medeiros  
CRBio-44147/04-D

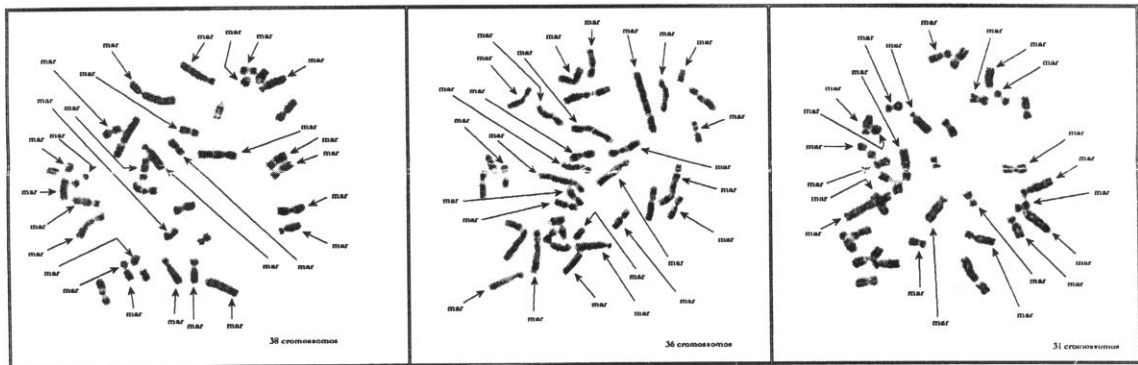


## ESTUDO CITOGENÉTICO

**Material:** Células de câncer de mama MGSO-32 em frascos de cultura.

### ANÁLISE

- Número de cromossomo por metáfase: **31 – 38 cromossomos**
- Cromossomos marcadores por metáfase: **23 – 27 cromossomos por metáfase**
- Características morfológicas dos cromossomos marcadores:
  - Metacêntricos grandes
  - Metacêntricos pequenos
  - Acrocêntricos grandes
  - Acrocêntricos pequenos
  - Sub metacêntricos pequenos
- Cromossomos normais encontrados: **2, 12, 14, 16, 21, 22 e X**




### RESULTADO

Todas as metáfases analisadas foram hipodiplóide (31 a 38 cromossomos).  
Em todas as metáfases analisadas a maioria dos cromossomos eram marcadores (23 a 27 cromossomos).

### CONCLUSÃO

Presença de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, representativas de re-arranjos cromossômicos complexos.

Belo Horizonte, 09 de março de 2010

  
Dra. Dora Méndez del Castillo  
CRM – 35197

  
Geni Soares Medeiros  
CRBio-44147/04-D



# **ANEXO 4**

Artigos & Resumos

2/1/13

Gmail - Fwd:



Natássia Caroline <natassiaresende@gmail.com>

---

**Fwd:**

---

Natássia Caroline <natassiaresende@gmail.com>  
Para: Natássia Caroline <natassiaresende@gmail.com>

1 de fevereiro de 2013 22:01

Ref.: Ms. No. JCST-12-134R1

SET domain-containing protein 4 (SETD4) is a newly identified cytosolic and nuclear lysine methyltransferase involved in breast cancer cell proliferation  
Journal of Cancer Science & Therapy

Dear Dr. Gomes,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Cancer Science & Therapy.

It was accepted on Jan 16, 2013

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.


Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,  
Richard Akul  
for Editor-in-Chief  
Journal of Cancer Science & Therapy

Comments from the Editors and Reviewers:

---

**2 anexos**

 all figures.pdf  
856K

 Manuscript.doc  
212K

**SET domain-containing protein 4 (SETD4) is a newly identified cytosolic and nuclear lysine methyltransferase involved in breast cancer cell proliferation**

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria<sup>1</sup>, Natássia Caroline Resende Corrêa<sup>1</sup>, Carolina de Andrade<sup>1</sup>, Ana Carolina de Angelis Campos<sup>1</sup>, Rubens dos Santos Samuel de Almeida<sup>2</sup>, Thiago Souza Rodrigues<sup>3</sup>, Alfredo Miranda de Goes<sup>1</sup>, Dawidson Assis Gomes<sup>1,4</sup>, Fábio Pittella Silva<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup>College of Health Sciences, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

<sup>3</sup>Computer Department, Federal Center of Technological Education of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work.

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Dawidson Assis Gomes

Department of Biochemistry and Immunology

Federal University of Minas Gerais

Av. Antonio Carlos 6627

Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

Telephone: 55-31-34092631

E-mail: [dawidson@icb.ufmg.br](mailto:dawidson@icb.ufmg.br)

2

### 3 <sup>99m</sup>Tc-labeled bombesin analog for breast cancer identification

4 André Luís Branco de Barros · Luciene das Graças Mota ·  
5 Caroline de Aguiar Ferreira · Natássia Caroline Resende Corrêa ·  
6 Alfredo Miranda de Góes · Mônica Cristina Oliveira ·  
7 Valbert Nascimento Cardoso

8 Received: 20 August 2012  
9 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2012

10 **Abstract** Bombesin is a tetradecapeptide that binds spe-  
11 cifically to gastrin releasing peptide receptors in humans.  
12 Several forms of cancer, including lung, prostate, breast,  
13 and colon express receptors for bombesin-like peptides.  
14 Radiolabeled bombesin analogs with a high affinity for  
15 these receptors might therefore be used for scintigraphic  
16 imaging of these tumor types. A truncated bombesin  
17 derivative (HYNIC-βAla-Bombesin<sub>(7-14)</sub>) was radiolabeled  
18 with technetium-99m using EDDA and tricine as coli-  
19 gands. In vitro stability was evaluated in presence of  
20 plasma and excess of cysteine. The receptor-binding  
21 affinity assays was evaluated in MDA-MB-231 cancer cell  
22 line. In addition, in vivo biodistribution was performed in  
23 nude mice bearing breast tumor. In vitro assay showed a  
24 good affinity for the MDA-MB-231 cell line, showing  
25 20.0 % of internalization at 4 h post-administration. <sup>99m</sup>Tc-  
26 HYNIC-βAla-Bombesin<sub>(7-14)</sub> biodistribution revealed a  
27 rapid clearance and a significant renal excretion. In addi-  
28 tion, tumor uptake was higher than non-excretory organs,

such as the spleen, the liver, and muscles. Tumor-to-muscle  
and tumor-to-blood ratios for <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-βAla-Bom-  
besin<sub>(7-14)</sub> showed high values at 4 h post-injection (5.34  
and 4.55, respectively). Furthermore, blocked studies using  
cold bombesin peptide were performed, which demon-  
strated an important decrease in tumor uptake, indicating a  
tumor specificity for <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-βAla-Bombesin<sub>(7-14)</sub>.  
The <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-βAla-Bombesin<sub>(7-14)</sub> displayed suitable  
radiochemical characteristics, and adequate affinity to  
breast tumor cells (MDA-MB-231). Therefore, this analog  
can be considered as a candidate for the identification of  
bombesin-positive tumors.

**Keywords** Bombesin · MDA-MB-231 · Breast tumor ·  
Scintigraphic imaging · Diagnosis · Radiolabeled peptide

#### Introduction

Cancer is among the most common causes of death  
throughout the world. In 2008, approximately 13 million  
new cancer cases and 7.6 million cancer deaths are estimated  
to have occurred worldwide [1]. Cancer imaging techniques  
using radiotracers targeted to specific receptors have yielded  
successful results, demonstrating the utility of such  
approaches for developing specific radiopharmaceuticals  
[2–7]. Molecular imaging of tumor metabolism, prolifera-  
tion, and other-specific targets is a powerful tool in the  
diagnosis, staging, restaging, response evaluation and  
guiding surgery, radiotherapy, and systemic treatment [8, 9].

Regulatory peptide receptors are over-expressed in  
numerous human cancer cells. These receptors have been  
used as molecular targets for radiolabeled peptides to  
locate tumors. In recent years, many studies have been  
performed to identify peptide analogs able to target these

A1 A. L. B. de Barros · C. de Aguiar Ferreira ·  
A2 M. C. Oliveira · V. N. Cardoso (✉)  
A3 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,  
A4 Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais  
A5 31270-901, Brazil  
A6 e-mail: valbertcardoso@yahoo.com.br

A7 L. das Graças Mota  
A8 Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais,  
A9 Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais  
A10 30130-100, Brazil

A11 N. C. R. Corrêa · A. M. de Góes  
A12 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Fedeml de Minas  
A13 Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais  
A14 31270-901, Brazil

# Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and anticancer activity of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles

Guilherme Carneiro<sup>1</sup>  
Elton Luiz Silva<sup>1</sup>  
Layssa Alves Pacheco<sup>1</sup>  
Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>2</sup>  
Natássia Caroline Resende Corrêa<sup>2</sup>  
Alfredo Miranda de Goes<sup>3</sup>  
Mônica Cristina de Oliveira<sup>1</sup>  
Lucas Antônio Miranda Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>2</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence: Lucas Antônio Miranda Ferreira  
Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil  
Tel +55 31 3409 6939  
Fax +55 31 3409 6830  
Email lucas@farmacia.ufmg.br

**Abstract:** This work aims to develop solid lipid nanoparticles (SLNs) loaded with retinoic acid (RA) to evaluate the influence of two lipophilic amines, stearylamine (SA) and benethamine (BA), and one hydrophilic, triethylamine (TA), on drug-encapsulation efficiency (EE) and cytotoxicity in cancer cell lines. The SLNs were characterized for EE, size, and zeta potential. The mean particle size decreased from  $155 \pm 1$  nm (SLNs without amine) to  $104 \pm 4$ ,  $95 \pm 1$ , and  $96 \pm 1$  nm for SLNs prepared with SA, BA, and TA, respectively. SA-RA-loaded SLNs resulted in positively charged particles, whereas those with TA and BA were negatively charged. The EEs were significantly improved with the addition of the amines, and they increased from  $36\% \pm 6\%$  (without amine) to  $97\% \pm 2\%$ ,  $90\% \pm 2\%$ , and  $100\% \pm 1\%$  for SA, TA, and BA, respectively. However, stability studies showed higher EE for BA-RA-loaded SLNs than TA-RA-loaded SLNs after 30 days. The formulations containing SA loaded or unloaded (blank SLNs) with RA were cytotoxic in normal and cancer cell lines. In contrast, the blank SLNs containing TA or BA did not show cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7), while RA-loaded SLNs with the respective amines were significantly more cytotoxic than free RA. Furthermore, the cytotoxicity of BA-RA-loaded SLNs was significantly higher than TA-RA-loaded SLNs. These findings are in agreement with the data obtained in the evaluation of subdiploid DNA content and cell-cycle analysis, which showed better anticancer activity for BA-RA-loaded SLNs than TA-RA-loaded SLNs and free RA. Taken together, these findings suggest that the BA-RA-loaded SLN formulation is a promising alternative for the intravenous administration of RA in the treatment of cancer.

**Keywords:** solid lipid nanoparticles, all-trans retinoic acid, cancer, treatment, antitumor activity, ion pairing

## Introduction

Vitamin A and its derivatives have the ability to reduce tumor growth and to induce apoptosis and differentiation in several types of cancer. In particular, all-trans retinoic acid (RA) has been studied for the treatment of cancer, including leukemia and breast cancer. The action of RA is attributed to its binding to the nuclear receptors, retinoic acid receptors, and retinoid X receptors, which regulate a variety of genes. RA can generally block the cell cycle in the G1 phase, causing cell proliferation inhibition and apoptosis.<sup>1</sup> The most effective clinical use of RA for human diseases was demonstrated in the treatment of acute promyelocytic leukemia.<sup>2,3</sup>

In clinical trials, RA has been given to cancer patients by oral administration. However, the bioavailability of oral RA has been considered low and quite variable.<sup>4</sup>



**SBBN 2010**

**VII Congresso da Sociedade Brasileira  
de Biociências Nucleares  
VII Congress of the SBBN**

## Certificado

Certificamos que o trabalho ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS COMPUTADORIZADAS DO COMPLEXO 99MTC-HYNIC-BOMBESINA(7-14) EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE MAMA de autoria ANDRÉ LUIS BRANCO DE BARROS; LUCIENE DAS GRACAS MOTA; NATÁSSIA CAROLINE RESENDE CORRÊA; CAROLINA FERREIRA DE AGUIAR; MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA; ALFREDO MIRANDA GOES e VALBERT NASCIMENTO CARDOSO foi apresentado no formato de Apresentação Oral no VII Congresso Brasileiro de Biociências Nucleares, realizado no período de 27 a 30 de outubro de 2010, no Mar Hotel em Recife - Pe.

Ademir Amaral  
Presidente

Edvane Borges  
1º Tesoureira

Patrocinadores



aparecimento de forma circular aberta no perfil eletroforético (ausente no controle). O perfil eletroforético do DNA plasmidial não foi modificado pelo extrato aquoso de Hibiscus sabdariffa L. em nenhuma das concentrações utilizadas. Esse extrato também não alterou o efeito do cloreto estano em esse modelo experimental. Conclusão: A análise qualitativa dos resultados sugere que o extrato aquoso de Hibiscus sabdariffa L. não apresenta um potencial genotóxico (não altera o perfil eletroforético de DNA plasmidial) e não confere proteção contra o efeito lesivo do cloreto estano.

AO009

[365] LIPOSSOMAS MODIFICADOS MARCADOS COM 99mTc PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FOCO INFLAMATÓRIO EM UM MODELO EXPERIMENTAL. LUCIENE DAS GRAÇAS MOTA<sup>1</sup>; ANDRÉ LUIS BRANCO DE BARROS<sup>2</sup>; TALITA GUIEIRO RIBEIRO ROCHA<sup>3</sup>; SHIRLEIDE SANTOS NUNES<sup>4</sup>; SIMONE ODILIA FERNANDES<sup>5</sup>; MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA<sup>6</sup>; VALBERT NASCIMENTO CARDOSO<sup>7</sup>.  
1.ENGENHARIA NUCLEAR-UFGM, BELO HORIZONTE, MG, BRASIL; 2,3,4,5,6,7.FACULDADE DE FARMÁCIA-UFGM, BELO HORIZONTE, MG, BRASIL.

Nas doenças inflamatórias, o diagnóstico prematuro e a localização do foco são essenciais para um tratamento adequado. Neste caso, a cintilografia desempenha um importante papel na avaliação dos pacientes, pois permite a visualização de processos fisiopatológicos em seu estágio inicial, ao contrário dos métodos de imagens convencionais, baseados em alterações anatômicas. Dentre os novos radiofármacos utilizados na detecção de focos inflamatórios estão os lipossomas radiomarcados que são nanoestruturas de liberação de drogas que, dependendo da composição de sua membrana lipídica, confere às vesículas sensibilidade ao pH e capacidade de longa circulação sanguínea. A proposta deste trabalho, foi desenvolver um novo radiofármaco baseado em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo <sup>99m</sup>Tc-DTPA (SpHL-<sup>99m</sup>Tc-DTPA) para a identificação de foco inflamatório. Os lipossomas foram compostos por aPEG-DSPE/DOPE/CHEMS (concentração lipídica total de 20 mM e razão molar 0,5/6,5/3,0) e obtidos pelo método Banghan. As vesículas foram liofilizadas por 24 horas na presença de glicose (razão glicose:fosfolípidos de 5:1) como crioprotetor. O foco inflamatório foi induzido por injeção de 0,2mL de uma suspensão de Zymosan (5%) no músculo da pata anterior esquerda de ratos, enquanto que o músculo da pata contra-lateral foi usado como controle. Após 24 horas da indução do foco inflamatório, os lipossomas foram marcados com 370 MBq de <sup>99m</sup>Tc-DTPA e, em seguida, purificados por ultracentrifugação. Uma alíquota de 3,7 MBq de SpHL-<sup>99m</sup>Tc-DTPA foi injetada nos ratos, por via endovenosa. A biodistribuição dos SpHL-<sup>99m</sup>Tc-DTPA foi avaliada no músculo inflamado (esquerdo), músculo controle (direito), fígado, baço, rins, estômago e sangue nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a injeção. Os dados obtidos mostraram vesículas de SpHL-<sup>99m</sup>Tc-DTPA com tamanho adequado de 207,4 nm ± 8,5 e índice de polidispersão 0,291 ± 0,010. O percentual de encapsulação do <sup>99m</sup>Tc-DTPA nos lipossomas foi de 10,65% ± 2,15. Os estudos de biodistribuição e as imagens cintilográficas mostraram uma captação significativamente maior de SpHL-<sup>99m</sup>Tc-DTPA no músculo inflamado em relação ao músculo controle, em todos os tempos investigados (p<0,01). A relação músculo inflamado/músculo controle manteve-se maior do que 1,5 durante todo o tempo de investigação, atingindo um valor máximo de 2,42 ± 0,41 no tempo de 8h após a injeção dos

lipossomas radiomarcados. Os resultados obtidos sugerem que os SpHL-<sup>99m</sup>Tc-DTPA poderão ser utilizados como agentes de diagnóstico para a identificação de focos inflamatórios.

APOIO: CNEN, FAPEMIG, CNPq

AO010

[507] AVALIAÇÃO IN VITRO DA CAPTAÇÃO DE COMPLEXOS CATIONICOS DE TECNÉCIO EM CÉLULAS SENSÍVEIS E RESISTENTES DE SARCOMA UTERINO HUMANO MES-SA E MES-SA/DX5.

MONICK JUNHO DO AMARAL EVANGELISTA<sup>1</sup>; FABIO LUIZ NAVARRO MARQUES<sup>2</sup>; DÉBORA LEVY<sup>3</sup>; ADRIANO RADIN<sup>4</sup>; JORGE RUIZ<sup>5</sup>; SÉRGIO BYDŁOWSKI<sup>6</sup>; CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA<sup>7</sup>.  
1,2,4,7.LABORATÓRIO DE RADIOISOTOPIA CLÍNICA (LIM 43) - DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA - FMUSP, SÃO PAULO, SP, BRASIL; 3,5,6.LABORATÓRIO DE GENÉTICA E HEMATOLOGIA MOLECULAR (LIM 31) - FMUSP, SÃO PAULO, SP, BRASIL.

A expressão da glicoproteína-P (Pgp) está associada com o fenômeno de resistência às múltiplas drogas, de grande interesse para o diagnóstico e terapia de diversos tumores. Para visualizar a expressão dessa proteína através de imagem, complexos cationicos de tecnécio como o  $[[99mTc](MIBI)6]^+$  têm sido utilizados como marcadores. Neste trabalho, nós avaliamos o comportamento dos complexos  $[[99mTc](MIBI)6]^+$ ,  $[[99mTc](O)2(N,N'-(MeOBz)EN)2]^+$  e  $[[99mTc](O)2(N,N'-(MeOBz)EN)2]^+$  em células de sarcoma uterino humano selvagens (MES-SA) e resistentes a doxorubicina (MES-SA/Dx5). Os complexos foram preparados através da redução do íon  $TcO_4^-$  seguido da quelação dos ligantes específicos. A eficiência de marcação e a estabilidade dos complexos foram avaliadas por cromatografia em papel, a carga dos complexos foi determinada por eletroforese em papel e a lipofilicidade por partição em salina/octanol. As células foram incubadas com os complexos na presença ou ausência de verapamil, (um modulador de Pgp) e o sobrenadante e as células foram separados em diferentes tempos a fim de mensurar a radioatividade em cada componente. O rendimento de marcação dos complexos foi superior a 80% e estes também foram estáveis em pH de marcação por até 24 h, porém, esta mostrou-se diminuída quando na presença de cisteína e histidina. Os complexos demonstraram possuir carga positiva e lipofilicidade, com LogP entre 0.207 e 1.595. A captação do  $[[99mTc](O)2(N,N'-(MeOBz)EN)2]^+$  foi menor que 20% em ambas as linhagens celulares, enquanto que aos 60 minutos de incubação, a captação foi de  $1.72 \pm 0.15\%$  para o  $[[99mTc](MIBI)6]^+$  e de  $0.85 \pm 0.04\%$  para o  $[[99mTc](O)2(N,N'-(MeOBz)EN)2]^+$  na linhagem MES-SA, e na linhagem MES-SA/Dx5 foi de  $0.36 \pm 0.05\%$  e  $0.53 \pm 0.03\%$ , respectivamente. Embora os resultados do estudo de captação demonstraram que o  $[[99mTc](O)2(N,N'-(MeOBz)EN)2]^+$  teve sua captação levemente menor que o  $[[99mTc](MIBI)6]^+$  nas células, os resultados nos estimulam a pesquisar modificações estruturais na molécula para promover uma melhor interação com a Pgp. No entanto, ao contrário do esperado, o verapamil diminuiu a captação de ambos os complexos na linhagem MES-SA/Dx5, e novos experimentos serão realizados para resolver essa questão.

AO011

[364] ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS DO COMPLEXO 99mTc-HYNIC-BOMBESINA(7-14) EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE MAMA.

ANDRÉ LUIS BRANCO DE BARROS; LUCIENE DAS GRAÇAS MOTA; NATÁSSIA CAROLINE RESENDE

CORRÊA; CAROLINA FERREIRA DE AGUIAR; MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA; ALFREDO MIRANDA GOES; VALBERT NASCIMENTO CARDOSO.  
UFMG, BELO HORIZONTE, MG, BRASIL.

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Entre a população feminina o câncer de mama apresenta elevada incidência podendo, muitas vezes, causar a morte das pacientes. Neste contexto, tem-se buscado novas ferramentas visando um diagnóstico precoce e desta forma, melhorar as chances de cura das pacientes. Dentre estas, destacam-se as imagens cintilográficas, uma vez que avaliam alterações funcionais nos tecidos antes que alterações anatómicas sejam observadas. Tumores de mama apresentam maior expressão de receptores para o peptídeo

peptídeos podem ser utilizados na obtenção de imagens cintilográficas para o diagnóstico deste tipo de tumor. O presente trabalho teve como objetivo a marcação do peptídeo bombesina com tecnécio-99m e sua utilização para a identificação de tumores de mama, da linhagem MDA-MB-231, em camundongos C57/Bl6 NUDE. Em um frasco lacrado contendo 20 mg de tricina, 5 mg de EDDA, 10 µg de HYNIC-Bombesina(7-14) e 10 µg de cloreto estanofo foram adicionados 37 MBq de NaTcO<sub>4</sub>, esta preparação foi mantida em banho-maria fervente por 15 minutos. Após a marcação a pureza radioquímica foi determinada por ITLC. O rendimento de marcação foi superior a 95%. Em seguida, 7,4 MBq do <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bombesina foram administrados na veia da cauda de camundongos contendo tumor de mama, implantado na coxa posterior direita. Após os tempos de 1 e 4 horas os animais foram anestesiados e sacrificados. Órgãos como fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, pâncreas, tumor, músculo, cérebro e intestinos foram retirados, pesados e a radioatividade foi determinada em cintilador de poço. Os dados de biodistribuição mostraram maior captação pelo tecido tumoral em relação ao tecido controle (músculo) durante todo o experimento, sendo a maior relação tumor/músculo (5,34 ± 1,37) obtida 4 horas após a injeção do radiofármaco. As análises quantitativas (ROI) das imagens cintilográficas apresentaram resultados similares àqueles valores obtidos na biodistribuição. Os resultados obtidos sugerem que <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bombesina(7-14) poderia ser empregado como agente de diagnóstico, por meio de imagens cintilográficas, para tumores de mama com este tipo de linhagem de células.  
APOIO: FAPEMIG, CNEN

AO012

[395] PREPARATION OF FUNCTIONALIZED RADIOACTIVE GOLD NANOPARTICLES AS AGENTS FOR DIAGNOSTIC IMAGING.

ANAYIVE PÉREZ-REBOLLEDO; DEMÉTRIO ABREU SENA COSTA; PRYSILA RODRIGUES DA COSTA; RAQUEL GOUVEA DOS SANTOS.  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR, BELO HORIZONTE, MG, BRASIL.

In nanomedicine, the gold nanoparticles (AuNPs) have proven to be efficient for the diagnosis and therapy of various cancers. The interest in the development of the AuNPs is due to their extraordinary physics and chemistry properties resulting from the effect of their size in the nano scale. Despite its utility and great sensibility as contrast blood tomography imaging agent, the amount of gold necessary to produce such images is very high.  $\alpha = 0.411$  MeV,  $\beta_{\text{máx}} = \gamma$  emitter (198Au;  $T_{1/2} = 2.69$  days) may have the advantage to be

applied as molecular diagnostic tool for single photon emission tomography (SPECT) using only a very small amount of radioactive gold. In this work, AuNPs were synthesized in order to develop nanostructures for applications as imaging agents. The chemical and radiochemical studies of nanomaterials have been conducted. The surface of AuNPs was functionalized with a biocompatible polymer to enable its subsequent conjugation to drugs with antitumoral activity. The strategy used was to combine the hydrophilic polymer polyethylene glycol (PEG) to 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) for formation of Thiol-PEG. The techniques of dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and spectroscopy UV-Visible absorption were used to characterize the size and geometry of nanoparticles, as well as confirm their synthesis. The technique used to determine the concentration of gold in the dispersions was performed neutron activation in a nuclear reactor TRIGA MARK I IPR-R1. The results of TEM and UV-visible showed the formation of AuNPs dispersed in citrate with sizes between 3 and 8 nm with strong absorption of surface plasmon resonance at 519 nm. The acquisition of four products of AuNPs modified with PEG-Thiol in different stoichiometries, with maximal absorption around 530 nm and sizes from 3 to 10 nm, except for one of nanomaterials which recorded sizes around 60 nm. DLS results showed hydrodynamic diameters between 14 and 150 nm. The values of zeta for the prepared nanoparticles (pH 5.0 to 6.0) ranged  $\zeta$  potential (between -17.1 and -19.6 Mv) indicating stable colloidal suspensions. Five nanomaterials were characterized, further biocompatibility studies will be conducted to determine its potential use in clinical diagnosis.

Acknowledgement: the authors would like to thank the Microscopy Center-UFMG for technical support during electron microscopy work, and the CNPq, CAPES, Fapemig, INCT and CDTN/CNEN from Brazil for the financial support.

AO013

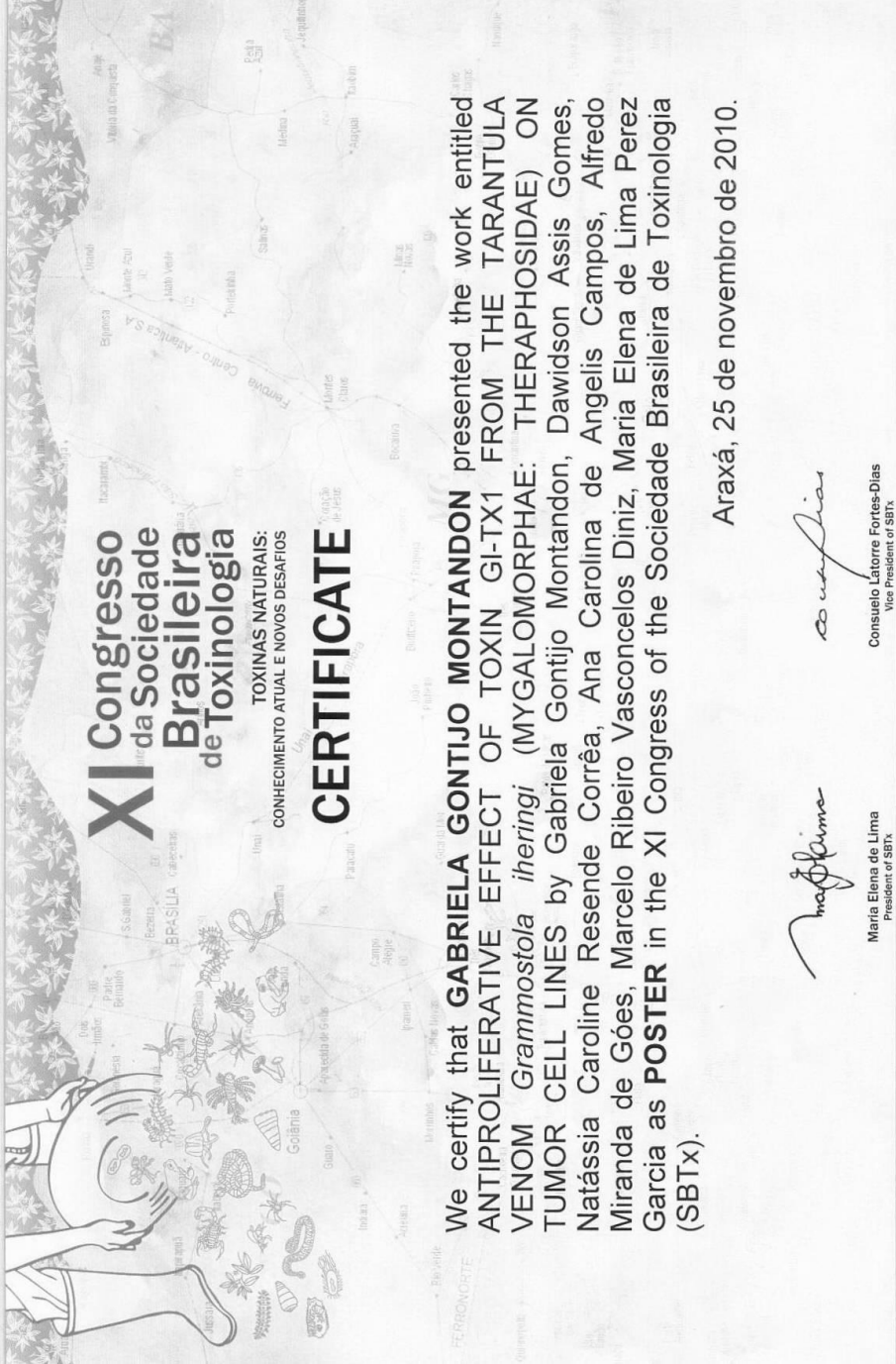
[348] EVALUATION OF AN UNCARIA TOMENTOSA EXTRACT: EFFECTS ON THE LABELING OF BLOOD CONSTITUENTS WITH TECHNETIUM-99M AND ITS PROTECTIVE ACTION ON THE SURVIVAL OF ESCHERICHIA COLI AB1157 CULTURES INCUBATED WITH STANNOUS CHLORIDE.

SILVANA RAMOS FARIAS MORENO<sup>1</sup>; JORGE JOSE DE CARVALHO<sup>2</sup>; ANA LÚCIA NASCIMENTO<sup>3</sup>; LUIZ QUERINO DE ARAÚJO CALDAS<sup>4</sup>; MÁRIO BERNARDO FILHO<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>UFF, RJ, NITERÓI, RJ, BRASIL; <sup>2,3,5</sup>UERJ- UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, RJ, BRASIL; <sup>4</sup>UFF- UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, NITERÓI, RJ, BRASIL.

Uncaria tomentosa (U. tomentosa) extract, has become described as an useful tool in ethnomedicine. The clinical studies have shown that this extract can increase cell DNA repair and may prevent cell mutations. Red blood cells (RBC) and plasma proteins are usually labeled with technetium-99m(Tc-99m) to be used as radiopharmaceuticals in health Sciences. Stannous chloride(SnCl<sub>2</sub>) solution is frequently used as reducing agent in the labeling with Tc-99m. In vitro studies have revealed that SnCl<sub>2</sub> can generate reactive oxidative species(ROS), as also it can reduce the bacteria survival. The aim of this study was to evaluate the effect (in vivo and in vitro) of the U. tomentosa extract on the labeling of blood constituents (BC) with Tc-99m and on the survival of Escherichia coli(E. coli) AB1157 strain incubated with SnCl<sub>2</sub>. For the in vivo study, blood samples(0.5mL) were obtained





# XI Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia

TOXINAS NATURAIS:  
CONHECIMENTO ATUAL E NOVOS DESAFIOS

## CERTIFICATE

We certify that **GABRIELA GONTIJO MONTANDON** presented the work entitled **ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF TOXIN GI-TX1 FROM THE TARANTULA VENOM *Grammostola iheringi* (MYGALOMORPHAE: THERAPHOSIDAE) ON TUMOR CELL LINES** by Gabriela Gontijo Montandon, Dawidson Assis Gomes, Natássia Caroline Resende Corrêa, Ana Carolina de Angelis Campos, Alfredo Miranda de Góes, Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz, Maria Elena de Lima Perez Garcia as **POSTER** in the XI Congress of the Sociedade Brasileira de Toxinologia (SBTx).

Araxá, 25 de novembro de 2010.

Maria Elena de Lima  
President of SBTx

Consuelo Latorre Fortes-Dias  
Vice President of SBTx

# XIV Jornada de Patologia

## IV Encontro Internacional de Patologia Investigativa do Hospital A.C.Camargo

**Natássia Caroline Resende Corrêa**

Participou do “**IV Encontro Internacional de Patologia Investigativa do Hospital A. C. Camargo e XIV Jornada Internacional de Patologia**”, realizado no Anfiteatro José Ermírio de Moraes no Hospital AC Camargo – São Paulo – SP, no período de 03 a 04 de Agosto de 2011, **na qualidade de**

**Menção Honrosa pelo trabalho:** “Transcriptional and phenotypic profiles of two breast cancer cell lines derived from primary human tumors”.

São Paulo, 04 de Agosto de 2011.

  
**Dr. Fernando Soares**

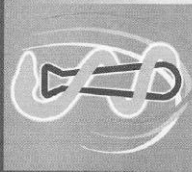
Diretor do Depto. de Anatomia Patológica/Coordenador do evento

  
**Luel Vicari**  
Gestora Executiva de Ensino

Realização



**Hospital**  
**A.C. Camargo**  
Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer



8<sup>th</sup> International Congress  
of Pharmaceutical Sciences  
**CIFARP 2011**

Ribeirão Preto, Brazil, August 21-24, 2011


We certify that the abstract entitled "IN VITRO ANTITUMORAL ACTIVITY OF ALL-TRANS RETINOIC ACID LOADED IN SOLID LIPID NANOPARTICLES" by authors: "CARNEIRO, G., SILVA, E. L., PEREIRA, A. P. S., GUERRA, J. C., ROMERO, C. F. D., FAGUNDES, E. M. S., CORRÊA, N. C. R., GOES, A. M., DE OLIVEIRA, M. C., FERREIRA, L. A. M." was presented in the poster session of the 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences -- CIFARP 2011, held on August 21-24, 2011 in the Convention Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Ribeirão Preto, Brazil, August 24<sup>th</sup>, 2011



Promotion



  
Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes  
Organizing Committee

  
Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque  
Dean of FCFRP-USP