UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

OTTO LUIZ DUTRA CERQUEIRA

Avaliação de marcadores de prognóstico no câncer de mama e análise funcional de CIP4

Versão da Tese corrigida

São Paulo

Data de depósito na CPG

07/03/2014

OTTO LUIZ DUTRA CERQUEIRA

Avaliação de marcadores de prognóstico no câncer de mama e análise funcional de CIP4

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Moraes Reis

São Paulo

2014

Otto Luiz Dutra Cerqueira

Avaliação de marcadores de prognóstico no câncer de mama e análise funcional de CIP4

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família: Meu pai César Cerqueira, minha Mãe, Rosa Maria Dutra Cerqueira e meu irmão Ezequiel R. Dutra Paraguassú, por sempre me incentivarem a perseguir meus sonhos e pelo exemplo de garra, luta e perseverança.

À Elaine Cristina Cardoso, o grande amor de minha vida, companheira em todos esses anos de doutorado. Vem compartilhando sonhos comigo todo este tempo e agora vai me proporcionar uma das coisas mais importantes em minha vida que é ser pai.

Ao Professor Dr. Eduardo M. Reis por me acolher em seu laboratório, por sua contribuição à minha formação e pela liberdade de escolher para estudar o que mais me interessei.

Ao Professor Dr. Sergio Verjovski-Almeida, por me oferecer a estrutura de seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Julia M. Alves por me abrir as portas do Instituto de Química.

À Professora Dra. Nathalie Cella pelos ensinamentos e pelo ano em que trabalhamos juntos. Ano de muito aprendizado.

Ao Professor Dr. Andrew Craig por me receber em seu laboratório no Canada, por seus ensinamentos, por sua paciência com meu Inglês e pela disponibilidade em me aceitar como pós-doc.

Ao professor Dr. Fernando Augusto Soares pela colaboração e me permitir acesso ao seu grupo de pesquisa.

À Professora Dra. Mari C. Sogayar por me receber no Nucel.

Aos professores que compõem a banca da defesa de minha tese.

Aos colaboradores do Hospital Ac Camargo: Dra. Cynthia A. B. Osório, e Dra. Mariana P. de Macedo pela grande ajuda e contribuições para os estudos com TMA.

Aos meus contemporâneos de Laboratório: Vinícius Coutinho (Feto), Yuri Moreira, Santiago Vilella, parceiros e amigos queridos.

Aos amigos de laboratório Ana Tahira, Felipe Beckedorff, Ana Ayupe, Carlos Deocesano, Kleber Parreira, Rodrigo Borges, Murilo Sena, Lauren Camargo, Ângela Fachel, Dinar Yunusov, Mariana Carvalho, Lucas, Esther Durães, Ester Bertoldi, Julio Sosa, Luís Bruno Cruz, Letícia Anderson, Giulliana Tessarin, Katia Oliveira, Gabriel Zaniboni, com todos vocês coletivamente aprendi muito. Durante bons anos de minha vida vocês foram minha família em Sampa.

Ao meu aluno de IC: Willian Felix. O amadurecimento científico só é completo quando transmitido. Obrigado por ter me proporcionado isto.

À turma do bloco 10: Mariana Longhi, Ketna Khusal, Mayara Klimuk, Leila Magalhães, Mariana Duarte, Renato Astorin, Darlene Pena, Denise Berti, Mateus Bonatto e Eliciane Matos que sempre me ajudaram seja com um reagente emprestado ou boas conversas à beira da bancada. O mais importante mesmo foi a amizade que cultivamos.

Á turma do Craig Lab: Harish Chander, Peter Truesdell. Joseph Ahn pela receptividade e boa convivência.

À técnica e secretária Stephanie Everingham pela enorme ajuda em assuntos burocráticos na Queen's University, e também por sua amizade.

À técnica Jalna Meens, parceira de bancada que muito ajudou no biotério e me ensinou os ensaios com animais em minha estadia na Queen's University, além de sua amizade.

Ao técnico Matt Gordon pela assistência no microscópio confocal e também pela excelente companhia em nossas rodas de música no Canadá.

Ao amigo argentino do Craig's Lab: Tomas Baldassarre que tanto me ajudou desde a conseguir a morada, quanto me enturmar no Canadá com seu excelente "Portunhol".

À toda turma da nossa banda "Rock'inase": Fábio Kendi (Pererê), Rodrigo Ribeiro (Tropeço), Carlos Gomes (Fufú), Rodrigo Zaini, Thibério Rangel, Alexandre Bisson pelos momentos divertidíssimos e aprendizado em música. *Long Live Rock'n'Roll* !

Aos amigos do IQ: Cícero Alves (Batata), Lucas Blanes, Raphael D. Teixeira, Valdir Blasios, Guilherme Lousada, Eliezer Stefanello, Érika Stein, Gabriela Mol, Matheus Dias pela companhia e boas lembranças que guardarei de vocês.

À turma do Crusp: Cleverson Busso (Bigode), Fernando Gomes, Márlio Silva, Josenilson Lima, Francisco Rocha, Daniel Silva, Sandro Detoni, Arthur Klick e Alice Lino, pela boa e divertida convivência que amenizaram esses difíceis anos do doutorado.

À excelente assistência técnica recebida: Renato Alvarenga, Bianca Dazzani, Jefferson dos Santos, Sueli Nonogaki (Hospital Ac Camargo), Roberto Zangrandi (Robertinho) e Célia Lúdio (Bloco 10). Agradeço também a secretária Ana Paula Vidal. Sem vocês a vida na pós seria muito mais difícil.

À CAPES por ter me financiado com minha bolsa de doutorado, incluindo a de doutorado sanduiche no Canadá.

À Universidade de São Paulo. Não tenho palavras para descrever o quanto seus ensinamentos foram grandiosos em minha vida. Agradeço pelo acolhimento em sua moradia, o Crusp. Orgulho-me por toda sua excelência e principalmente por ser uma Universidade pública! Espero que continue sempre assim.

A conclusão deste doutorado foi a realização de um sonho. Agradeço a todos aqueles (mesmo não citados aqui) que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta importante etapa de minha vida.

“Deus sive Natura”

Ethica / Baruch de Spinoza

Spinoza, Benedictus de, 1632–1677

“**Come forth into the light of things,**

Let nature be your teacher.”

William Wordsworth,1770-1850

Poeta Inglês

Resumo

Cerqueira, O.L.D. Avaliação de marcadores de prognóstico no câncer de mama e análise funcional de CIP4. 2014. 141p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea compreendendo diferentes subtipos moleculares que resultam em evoluções clínicas e condutas terapêuticas distintas. A maior gravidade desta patologia está associada a sua capacidade de formação de metástases Mudanças no padrão de expressão gênica têm sido associadas à manifestação do fenótipo metastático. Neste trabalho, utilizamos microarranjos de tecido (TMAs) para investigar a expressão de 8 biomarcadores candidatos (CIP4, PPIL1, ITGAV, AKAP14, MICA, FXYD1, ARPC3, ABG1) e avaliar seu potencial prognóstico em pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama. Destes, ARPC3 PPIL1 e CIP4 mostraram associações estatisticamente significativas com a sobrevida câncer específica e/ou a probabilidade de desenvolvimento de metástases. Determinamos que a expressão aumentada de CIP4 nos tumores está associada a maior probabilidade de desenvolvimento de metástases. CIP4 é uma proteína adaptadora descrita na literatura como moduladora de migração e invasão celular e portanto selecionamos este candidato para caracterização funcional detalhada. Observamos que a expressão de CIP4 encontra-se aumentada em linhagens tumorais com características invasivas. A partir do silenciamento estável e regulado de CIP4 na linhagem metastática MDA-MB-231, determinamos que CIP4 modula positivamente a ativação de MAPK-p38 e a expressão de MMP2, sugerindo que CIP4 participe em vias de sinalização importantes para a transição epitélio-mesenquima (EMT). O silenciamento de CIP4 resultou em uma redução de aproximadamente 50% da capacidade migratória e invasiva das células tumorais *in vitro*, e na diminuição da formação de metástases pulmonares *in vivo*. Coletivamente, nossos resultados indicam que CIP4 tem potencial como marcador de prognóstico assim como um possível alvo terapêutico no controle da disseminação de metástases nos tumores da mama.

Palavras-chave: câncer de mama, metástase, biomarcadores, CIP4, microarranjos de tecido.

Abstract

Cerqueira, O.L.D. CIP4. Evaluation of prognostic markers in breast cancer and functional analysis of CIP4, 2014. 141p. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Breast cancer is an extremely heterogeneous disease comprising different molecular subtypes that result in different clinical outcomes and therapeutic procedures. The severity of this disease is mainly associated with its ability to produce metastasis. Changes in gene expression profile have been associated with the manifestation of the metastatic phenotype. In this study, we used tissue microarrays (TMAs) to investigate the expression of 8 candidate biomarkers (CIP4, PPIL1, ITGAV, AKAP14, MICA, FXYD1, ARPC3 e ABG1) and to evaluate their prognostic potential in patients with invasive ductal breast carcinoma. Among these, ARPC3, PPIL1 and CIP4 showed statistically significant associations with cancer specific survival and/or the patient's probability to develop metastasis. We found that increased expression of CIP4 in tumors is associated with a higher probability of developing metastasis. CIP4 is an adaptor protein described in the literature as a modulator of cell migration and invasion and therefore we selected this candidate for detailed functional characterization. We observed that CIP4 expression is increased in tumor cell lines with invasive characteristics. Following the stable and regulated knockdown of CIP4 in the metastatic line MDA-MB-231, we determined that it modulates positively the activation of MAPK-p38 and the expression of MMP2, suggesting that CIP4 participates in important signaling pathways required for the epithelial mesenchymal transition (EMT). CIP4 silencing resulted in an approximate 50% reduction of the migratory and invasive capacity of tumor cells in vitro and decreased the generation of lung metastases in vivo. Collectively, our results indicate that CIP4 has potential as a prognostic marker as well as a potential therapeutic target to control the metastatic dissemination of breast tumors.

Keywords: Breast cancer, metastasis, biomarkers, CIP4, tissue microarrays

Lista de Ilustrações e Tabelas

Figura 1. Anatomia da mama e tipos celulares constituintes. 17
Figura 2. Corte transversal de ácino mamário em condições normais e neoplásicas 20
Figura 3. Transição epitélio-mesenquima..... 23
Figura 4. Da invasão local à disseminação de metástases 27
Figura 5. Genes diferencialmente expressos entre tumores primários de pacientes com câncer de mama que apresentaram ou não metástase 38
Figura 6. Classificação das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas segundo parâmetros de transição epitelial-mesenquimal (EMT). 44
Figura 7. Classificação dos pacientes de acordo com o status da expressão de receptores hormonais e HER2. 60
Figura 8. Detecção imunohistoquímica de marcadores candidatos em amostras de carcinoma de mama invasivo..... 62
Figura 9. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para PPIL1..... 66
Figura 10: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de PPIL1 68
Figura 11: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de PPIL1.. 70
Figura 12 Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para ITGAV..... 73
Figura 13: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de ITGAV. 75
Figura 14: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de ITGAV. 77
Figura 15. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamários corados imunohistoquímica para ARPC3..... 79
Figura 16: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de ARPC3. 81
Figura 17: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de ARPC3. 83
Figura18 Padrão de expressão de CIP4 em diferentes subtipos moleculares de carcinoma de mama..... 85
Figura 19: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de CIP4. 87
Figura 20. Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de CIP4. 89
Figura 21. A quantificação relativa de transcritos de gene TRIP10 por PCR em tempo real e a sua proteína (CIP4) por *western blot*..... 93

Figura 22. Detecção de CIP4 por imunofluorescência em linhagens celulares de mama com diferentes graus de malignidade 94
Figura 23. Imunomarcação de CIP4 em diferentes estágios de progressão do carcinoma de mama.. 96
Figura 24. Silenciamento indutível de CIP4 e seu efeito sobre a expressão dos seus parálogos TOCA1 e FPB17. 98
Figura 25. Efeito do silenciamento de CIP4 sobre a ativação de componentes da via de transdução de sinal de EGF..... 100
Figura 26. CIP4 promove a expressão de MMP2. 102
Figura 27. O silenciamento de CIP4 na linhagem MDA-MD-231 reduz as taxas de migração in vitro.. 104
Figura 28. CIP4 é um modulador positivo da migração e invasão celular *in vitro*.. 106
Figura 29. Silenciamento de CIP4 reduz as taxas de invasão em modelos de cultura tridimensionais.. 108
Figura 30. CIP4 não está relacionado com as taxas de crescimento do tumor primário nas mamas de camundongos Rag2-/-γc- fêmeas..... 110
Figura 31. CIP4 não está relacionado com as taxas de aparecimento de metástases a partir de células tumorais circulantes administradas pela veia caudal em camundongos RAG2-/-γC- / -..... 112
Figura 32. O silenciamento de CIP4 reduz as taxas de disseminação de metástases no pulmão de camundongos Rag2-/-γC-/-.. 114

Tabelas

Tabela 1: Descrição dos genes candidatos selecionados neste trabalho 39
Tabela 2. Anticorpos utilizados nos experimentos de TMA..... 55
Tabela 3: Associação entre a imunomarcação de CIP4 e parâmetros clinico-patológicos... 91
Tabela 4: Associação entre a expressão relativa do mRNA e da proteína codificada por genes candidatos a biomarcadores de prognóstico do carcinoma de mama. 117
Tabela 5: Relação entre a imunomarcação da proteína e a sobrevida câncer específica e probabilidade em desenvolver metástases. 121

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABCG1*: ATP-binding cassette sub-family G member 1*

AKAP14: *A Kinase (PRKA) Anchor Protein 14*

Akt: *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, também conhecida como Protein Kinase B (PKB)*

APC: *Adenomatous polyposis coli*

Arp2/3: *Actin-related protein complex*

ARPC3: *Actin related protein 2/3 complex (Gene)*

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

BCC: *Breast Cancer Cells*

BRCA1: *Breast cancer 1, early onset*

BRCA2: *Breast cancer 2, early onset*

CDI: Carcinoma Ductal Invasivo

CLI: Carcinoma Lobular Invasivo

CLL: *Chronic lymphocytic leukemia*

cDNA: *complementary DNA*

CHEK2: *CHK2 checkpoint homolog*

CIP4: *Cdc42-interacting protein 4*

CK: *Cytokeratin*

DAB: *3,3'-Diaminobenzidine*

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

ECM: *Extracellular matrix*

EDTA: *Diaminoethanetetraacetic acid*

EGF: *Epidermal growth factor*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EGF2 : *Epidermal growth factor receptor 2*

EMT: *Epithelial–mesenchymal transition*

ER: *Estrogen receptor*

F-BAR: *Fer/ CIP4 homology Bin/Anphiphysin/Rvs*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

FOXC2: *Forkhead box protein C2*

FXYD1: FXYD domain containing ion transport regulator 1, também conhecida como Phospholemman

GSK3β: Glycogen synthase kinase 3 beta

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

HR-1: *Cdc42-binding Homology Region 1*

IgG: *Immunoglobulin G*

IHC: *Immunohistochemistry*

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ITGAV: *Integrin, alpha V*

LOH: *Loss of heterozygosity*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MAPK-p38: *p38 mitogen-activated protein kinases*

MICA: *MHC class I polypeptide-related sequence A*

MMP2: *Matrix metalloproteinase 2*

MMP9: *Matrix metalloproteinase 9*

mRNA: *Messenger RNA*

MT1-MMP: *Membrane Type 1 Metalloprotease*

mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*

NaF: Fluoreto de Sódio

N-WASP: *N Wiskott–Aldrich syndrome protein*

P14ARF: *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

PFA: *Paraformaldehyde*

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*

PPIL1: *Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1*

PR: *Progesterone receptor*

PVDF: *Polyvinylidene fluoride*

RAD*: Ras Associated With Diabetes*

RIPA: *Radio-Immunoprecipitation Assay*

RNA: *Ribonucleic acid*

RT-PCR*: Reverse transcription polymerase chain reaction*

RT-qPCR: *Real-Time Quantitative PCR*

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyacrylAmide Gel Electrophoresis

SH3: *SRC Homology 3 Domain*

SIP1: *SMN Interacting Protein 1-Delta*

SLUG: *Snail Family Zinc Finger 2*

Snail: *Snail Family Zinc Finger 1*

Src: *V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)*

TBX2/3: *T-box transcription factor*

Tcf/Lef: *Transcription Factor 7 (T-Cell Specific, HMG-Box)*

TGFβ: *Transforming growth factor beta*

TMA: *Tissue Microarray*

TNBC: *Triple Negative Breast Cancer*

TP53 (p53): *P53 Tumor Suppressor*

TRIP10: *Thyroid hormone receptor interactor 10*

TWIST: *Twist Basic Helix-Loop-Helix (Transcription Factor 1)*

uPA: *Plasminogen Activator, Urokinase*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

WHO: *World Health Organization's cancer*

Wnt: Wingless-Type MMTV Integration

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

1.1. O câncer de mama 15

1.2. Anatomia funcional da mama e componentes celulares 16

1.3. Transição Epitélio-Mesenquima. 20

1.4. Invasão e metástase 25

1.5. Graduação histológica e estadiamento do carcinoma mamário invasivo 29

1.6. Classificação de neoplasias mamárias baseadas em marcadores moleculares. 31

1.7. Análise de expressão gênica em tumores de mama em larga-escala utilizando microarranjos de DNA. 35

1.8. Microarranjos de tecido como ferramenta de validação de marcadores de prognóstico. 40

1.9. O uso de linhagens celulares como ferramenta de estudo funcional de genes no câncer de mama. 42

2. OBJETIVOS 45

3. MATERIAIS E MÉTODOS 46

3.1. Linhagens celulares e meios de cultura 46

3.2. *Western blot* 46

3.3. Imunofluorescência 47

3.4. PCR em Tempo Real 48

3.5. Produção de partículas lentivirais para silenciamento por shRNA 49

3.6. Ensaios de migração e invasão *in vitro* 49

3.7. Tumorigênese e potencial metastático *in vivo* 51

3.8. Análises estatísticas 52

3.9. Experimentos com Tissue Microarrays 53

3.9.1 Casuística 53

3.9.2 Reação de imunohistoquímica 54

3.9.3 Processamento e análise estatística dos dados de imunomarcação obtidos com TMAs 55

3.9.2 MMP Array 58

4. RESULTADOS 59

4.1. Prevalência dos subtipos moleculares de câncer de mama 59

4.2. Detecção imunohistoquímica das proteínas em tumores de mama utilizando TMAs 61

4.3. PPIL1 65

4.4. ITGAV 71

4.5. ARPC3 78
4.6. CIP4 84
4.6.1 A expressão de CIP4 está diminuída no subtipo Luminal A 84
4.6.2 Expressão de CIP4, sobrevida e probabilidade de desenvolvimento de metástases 86
4.6.3 CIP4 tem a expressão aumentada em linhagens celulares tumorais de mama com potencial metastático e se localiza focalmente na membrana celular 92
4.6.4 Células mioepiteliais expressam CIP4 em ácinos normais 95
4.6.5 O silenciamento estável e regulado de CIP4 não altera a expressão de seus parálogos Toca1 e FPB17 97
4.6.6 Depleção de CIP4 reduz a fosforilação de MAPK-p38 99
4.6.7 CIP4 modula positivamente a expressão da metaloproteinase MMP2 101
4.6.8 CIP4 regula positivamente a migração e invasão de células MDA-MB-231 *in vitro* 103
4.6.9 O silenciamento de CIP4 reduz a incidência de metástases em pulmões de camundongos Rag2-/-γC -/- 109
5. DISCUSSÃO 115
5.1. TMA como ferramenta de validação do microarranjo de cDNA 116
5.2. Relação do nível de expressão proteica dos genes candidatos e a sobrevida / incidência de metástases 119
5.3. Concentração das proteínas expressas pelos genes candidatos de acordo com o subtipo molecular do tumor 122
5.4. Principais dificuldades e limitações da estratégia adotada para as análises de TMA 125
5.4.1 PPIL1 126
5.4.2 AKAP14 127
5.4.3 ITGAV 128
5.4.4 MICA 130
5.4.5 FXYD1 131
5.4.6. ABCG1 133
5.4.7 ARPC3 134
5.5. Análise funcional de CIP4 135
6. CONCLUSÕES 140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 142
ANEXOS 155

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo (excluindo melanomas) e o mais comum entre as mulheres. No Brasil é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, com 52.680 novos casos previstos para 2012. Homens também são acometidos por câncer de mama, embora com uma taxa bastante inferior, com cerca de 50 casos documentados no mesmo período (INCA 2012). É uma doença extremamente heterogênea e de difícil acompanhamento por compreender um grande espectro de subtipos tumorais com diferentes características biológicas, respostas terapêuticas e comportamento clínico (Ferlay et al. 2010; Siegel et al. 2012). Apesar dos inúmeros avanços na compreensão desta neoplasia, essas estatísticas persistem.

A predisposição familiar foi apontada como um fator de risco, sendo que uma paciente que teve a mãe ou irmã acometida por câncer de mama tem riscos significativamente maiores de também desenvolver esta neoplasia (Boyd 2014). O câncer de mama hereditário é caracterizado pela herança de mutações, geralmente em heterozigose, que envolve genes envolvidos no reparo de DNA, como *BRCA1* (majoritariamente), *BRCA2, TP53, CHEK2* e *ATM* (Hall et al. 1990; Miki et al. 1994; Wooster et al. 1995; Bogdanova et al. 2013; Boyd 2014). Quando há perda da heterozigose (LOH), seja por mutação somática ou metilação do promotor inativando a expressão do alelo normal, a célula acumula mutações que fatalmente resultam na instabilidade genômica precursora de neoplasias (Ha et al. 2012). Embora os alelos mutantes acelerem o processo, eles não são determinantes, e mutações adicionais incluindo àquelas no alelo normal do gene mutante, são necessárias para a

manifestação do fenótipo maligno. Apesar de sua importância, menos de 5% dos casos de câncer de mama pode ser atribuída à história familiar da doença (Lux et al. 2006).

De fato a maiorias dos casos de câncer de mama são esporádicos, ou seja, são ocasionados por efeitos ambientais ou fatores de risco ligados ao estilo de vida da mulher. A idade é o principal fator de risco, 65% dos pacientes têm mais de 55 anos de idade no momento do diagnóstico (Lux et al. 2006). Alguns estudos sugerem que a terapia de reposição hormonal, a exposição à radiação ionizante ou à carcinógenos químicos, tabagismo, alta densidade da mama, estados inflamatórios crônicos, obesidade, sedentarismo e excesso de ingestão de álcool tendem a aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Enquanto que a gravidez (especialmente precoce), a amamentação, exercícios físicos e dieta saudável são associados com uma diminuição do risco (Apter and VIHKO 1983; Helmrich et al. 1983; Kelsey et al. 1993; McPherson et al. 2000; Boyd et al. 2002; Pierobon and Frankenfeld 2013). O uso de contraceptivos orais parece não aumentar o risco de câncer mamário (Pike et al. 1981), embora hajam controvérsias (Grabrick et al. 2000).

1.2. Anatomia funcional da mama e componentes celulares

O órgão mamário da mulher adulta, em condições fisiológicas normais, é formado por tecidos epiteliais e estromais, dispostos numa arquitetura ramificada e arborescente (Figura 1A). O componente epitelial é formado por células lobulares, ductais e mioepiteliais (Figura 1B e 1C). As células lobulares se agrupam formando os ácinos (ou alvéolos), que são responsáveis pela produção de leite durante a fase

lactante (Figura 2A). As células ductais organizam-se para formar os ductos, que interconectam os ácinos (unidade ducto-lobular terminal). Estas estruturas confluem para a formação de ductos lactíferos progressivamente maiores que desembocam no mamilo (Figura 1A).

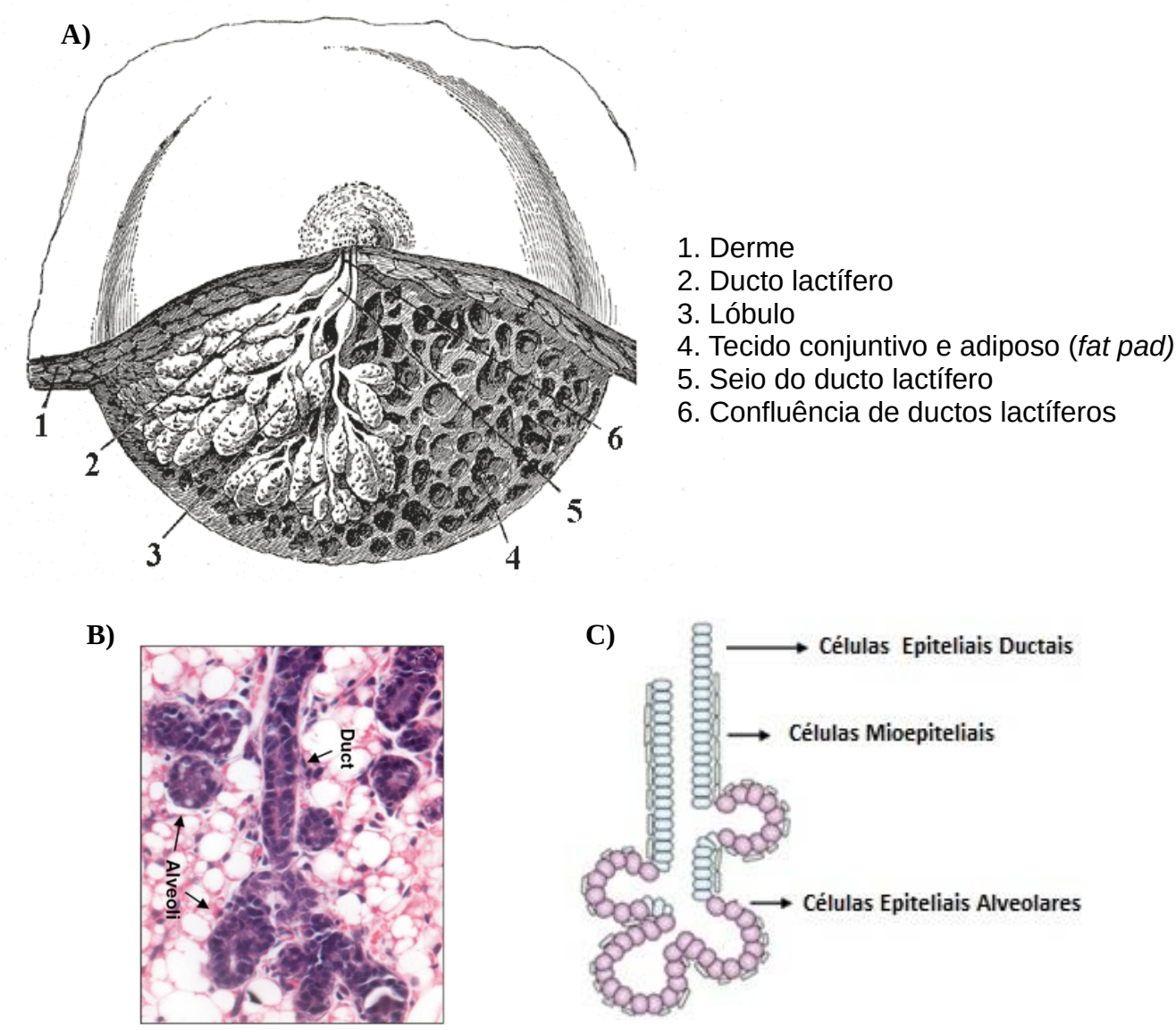


Figura 1. Anatomia da mama e tipos celulares constituintes. **A)** Esquema de corte longitudinal da mama revelando sua organização histológica. (Modificado de: (The_Human_Protein_Atlas_1 2014)). **B)** Corte histológico da mama em condição fisiológica normal, corado com H&E, mostrando a Unidade Ducto-lobular Terminal. **C)** Esquema representativo nominando os constituintes celulares do ducto terminal em azul e alveolares (ácinos) em roxo. As células mioepiteliais, em branco, podem ser visualizadas margeando toda a Unidade ducto-lobular terminal.

As células mioepiteliais recobrem tanto os ácinos, quanto os ductos, sendo responsáveis pelas contrações que conduzirão o leite produzido nos ácinos até sua secreção final no mamilo (Figura 1B e 1C). O componente estromal é composto de quantidade variável de tecidos adiposo e conjuntivo, que compreende a maior parte do volume da mama no estado fisiológico não lactante (Figura 1A). (Vorherr 1974; Hassiotou and Geddes 2013).

Na maioria dos casos, os carcinomas mamários originam-se do epitélio dos lóbulos e/ou ductos da glândula mamária. Quando tem origem na porção glandular é denominado **Carcinoma lobular.** Já o **Carcinoma Ductal** é o que se origina da camada epitelial precursora dos ductos mamários. Em termos clínicos, ambos podem se apresentar sob a forma de **carcinoma in situ**, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário, e **carcinoma invasivo**, o qual em estágios mais avançados pode atravessar os limites teciduais e disseminar metástases para sítios secundários (Ellis 2010).

O corpo feminino pode prescindir de suas glândulas mamárias sem comprometimento de funções fisiológicas vitais, exceto na amamentação. Nesse sentido, quase todos os carcinomas de mama benignos, não comprometem a sobrevivência enquanto estão confinados às mamas. As áreas acometidas por carcinoma *in situ*, quando detectadas precocemente, podem ser removidas cirurgicamente (mastectomia total ou conservadora) sem maiores riscos à paciente. Embora traga impactos psicológicos e na autoestima da mulher, a mastectomia é, em muitos casos, uma opção terapêutica curativa e com mínimas chances de recidiva (Fisher et al. 1985; Veronesi et al. 2002). A maior morbidade de neoplasias mamárias, entretanto, refere-se ao carcinoma invasivo, principalmente quando

metástases são detectadas. O que repercute numa doença sistêmica com prognóstico muito mais desfavorável.

Uma característica fundamental da diferenciação mamária é a formação de membrana basal, sintetizada e disposta na interface do epitélio das unidades ducto-lobulares e o estroma subjacente (Figura 2A) (Streuli et al. 1991). Seus principais constituintes são o colágeno tipo IV, nidogênio, laminina, fibronectina e proteoglicanos heparan-sulfato. As células mioepiteliais expressam altos níveis de colagenase tipo IV, e postula-se que tenha atividade crítica nos processos de renovação da membrana basal e remodelagem de glândulas. (Monteagudo et al. 1990). Há relatos na literatura que apontam as células mioepiteliais como supressoras naturais da progressão de neoplasias mamárias (Sternlicht et al. 1997), bem como, regulam negativamente a invasão tecidual e metástases. Isto se dá, não só pela formação de uma barreira física entre as células luminais e o estroma, bem como o controle parácrino exercido pelas células mioepiteliais (Sternlicht et al. 1997; Barsky and Karlin 2005).

Há evidências de que as células mioepiteliais também exerçam interações heterotípicas com células do estroma (Figura 2B). Por muito tempo, o papel dessas células foi negligenciado na progressão tumoral de neoplasias mamárias, porém evidências apontam que as células mioepiteliais perdem suas funções e, eventualmente, diminuem a população em lesões *in situ* pré-malignas, sendo ausentes no carcinoma invasivo. (Figura 2B). (Nakanishi et al. 2010). Por razões ainda não compreendidas, as células malignas (sobretudo as *Basal-like*) no carcinoma invasivo mostram um padrão de expressão gênico semelhante ao das células mioepiteliais. Essa mudança do perfil de expressão foi demonstrado para o gene da Maspina (Bergamaschi et al. 2009). Evidências acumuladas sugerem que

durante a progressão de lesões pré-malígnas, algumas células sofram uma mudança fenotípica conhecida como Transição Epitélio-Mesenquima (Nakanishi et al. 2010).

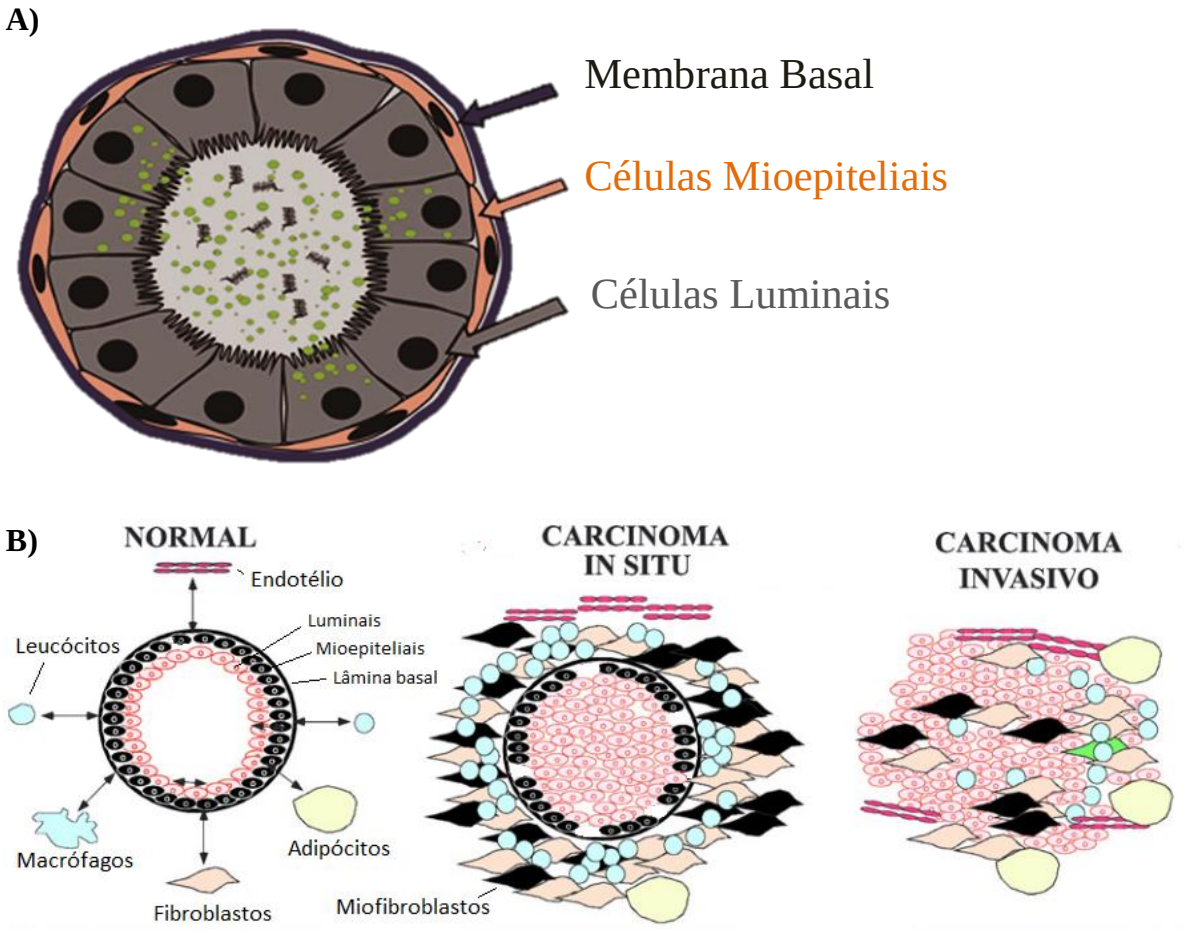


Figura 2. Corte transversal de ácino mamário em condições normais e neoplásicas. A) Esquema mostrando estrutura de um ácino completamente circunscrito pela membrana basal. As células mioepiteliais interagem intimamente com a membrana basal e, do outro lado, com as células luminais suportando a estrutura acinar. (Figura adaptada de (Hayes 1995)). **B)** Representação esquemática de ácinos em condições normais, no carcinoma *in situ* e no carcinoma invasivo. (Modificado de (Nakanishi et al. 2010)).

1.3. Transição Epitélio-Mesenquima

A Transição Epitélio-Mesenquima (do Inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*: EMT) pode ser definida como uma mudança fenotípica sofrida por células epiteliais que passam a se comportar como células mesenquimais (Yang et al. 2004;

Kalluri and Weinberg 2009). Em termos funcionais, na EMT as células adquirem forma de fibroblasto, com perda da polaridade, reorganização dos filamentos intermediários do citoesqueleto, mudança do padrão de integrinas na superfície celular, diminuição da adesão celular, aumento da mobilidade, maior capacidade de invasão e formação de projeções citoplasmáticas (Figura 3C). Devido à dissolução das interações homotípicas nas junções célula-célula, as células apresentam desagregadas umas das outras. O padrão epitelial cubóide é substituído pelo padrão fusiforme de células individualizadas (Anastasiadis and Reynolds 2001; Grosheva et al. 2001; Jeanes et al. 2008).

Dentre as características fenotípicas afetadas neste processo, podem se destacar a perda da expressão de citoqueratinas (filamento intermediário), perda da expressão de E-caderina presente nas junções aderentes epiteliais, concomitante a aquisição de programa de expressão de genes mesenquimais como N-caderinas presente nas junções aderentes de células mesenquimais, expressão de vimentina (filamento intermediário), expressão da metaproteinase MT-MMP1, secreção e ativação de metaloproteinase MMP2 (principalmente) e expressão de diferentes perfis de integrinas (Yang et al. 2004; Taki et al. 2006; Cheang et al. 2009; Kalluri and Weinberg 2009).

A β-catenina é uma proteína que tem dupla localização (e função) – faz parte das junções aderentes na membrana associando a E-caderina ao citoesqueleto e também pode se translocar para o núcleo atuando como fator de transcrição de genes sob controle do promotor Tcf/Lef (Figura 3A) (Polakis 1999; Cheang et al. 2009; Denadai and Souto 2013). Quando a E-caderina tem sua expressão reprimida, a β-catenina torna-se livre para translocar ao núcleo e induzir a expressão de genes envolvidos na manifestação do fenótipo mesenquimal (Polakis 1999; Graham et al.

2000). A β-catenina citoplasmática é parte de um complexo multi-proteico formado por GSK3β, APC, axina entre outras (Figura 3B). Em situações de homeostasia epitelial, este complexo é responsável pela inativação e proteólise d β-catenina impedindo-a de translocar-se. Em situações que deflagram a EMT, como estímulo por ligante Wnt, ativação da cascata via Ras, inibição de GSK3β, entre outras, a β Catenina é liberada deste complexo e transloca-se para exercer suas funções moduladoras da transcrição (Polakis 1999; Charpentier and Martin 2013). Portanto, inibidores de GSK3β podem induzir EMT.

Kim e colaboradores demonstraram que na linhagem celular epitelial não malígna MCF10A, o tratamento com TGFβ induziu a manifestação do fenótipo mesenquimal. Foi demonstrado que TGFβ induziu a ativação de MAPK-p38, o que resultou, de forma dependente, no aumento da expressão e da atividade de MMP2 e MMP-9 (Kim et al. 2004). A ativação de MMP2 por MAPK-p38, também foi demonstrada por outros grupos (Zhong et al. 2006; Kumar et al. 2010). Alguns grupos tem utilizado a expressão de MMP2 como um dos parâmetros fundamentais para a constatação de EMT (Taki et al. 2006; Wu 2006; Xu et al. 2009).

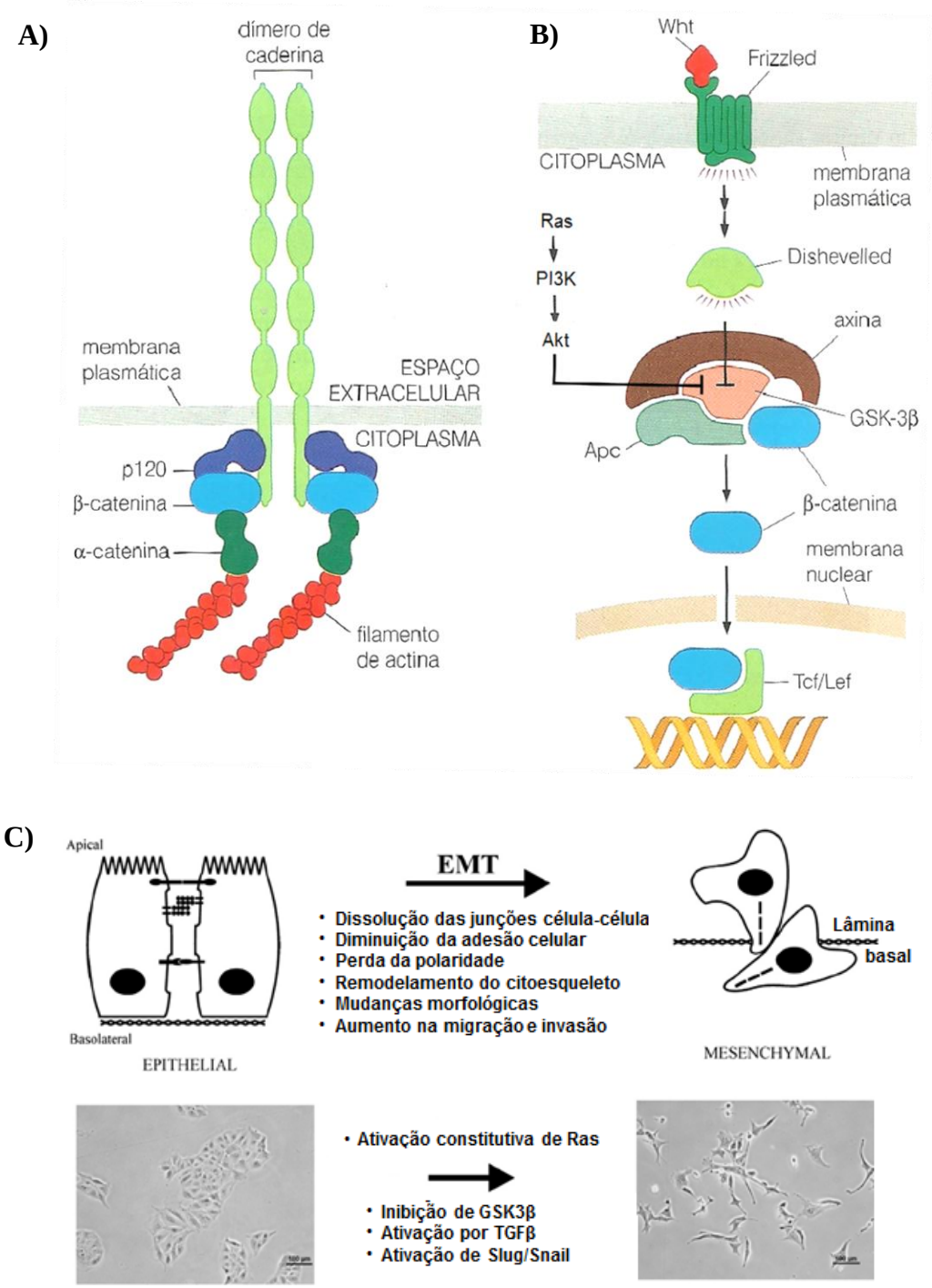


Figura 3. Transição epitélio-mesenquima. A) Esquema mostrando a interposição de β-catenina entre as proteínas de junção celulares E-Caderinas e os filamentos de F-Actina do citoesqueleto (Figura retirada de:(Weinberg 2006)). **B)** No citoplasma, β-catenina é parte de um complexo proteico que está sujeito à regulação de Wnt, Ras e GSK3β. Quando liberada deste complexo transloca-se ao núcleo modulando a expressão de genes *downstream* a Tcf/Lef. (Figura retirada de:(Weinberg 2006)) **C)** Ilustração resumindo as principais mudanças morfo-funcionais sofridas pela célula durante a EMT.

A EMT, na maioria dos casos, acontece normalmente como um processo fisiológico e é associado a diferentes etapas do desenvolvimento embrionário. Alguns fatores de transcrição foram identificados como controladores de EMT em etapas específicas da embriogênese, dentre os quais destacam-se o SLUG, Twist, Snail, SIP1 e FOXC2. (Papin et al. 2002; Thiery 2002; Zhang and Klymkowsky 2009) Em adultos, a EMT pode ser desencadeada transitoriamente com o objetivo de reparo em tecidos injuriados (cicatrização) e os fatores transcricionais previamente descritos são expressos de maneira análoga. (Savagner 2001). Já em situações patológicas como o câncer, algumas evidências suportam que a expressão desses fatores transcricionais, agindo separadamente ou sinergicamente, podem induzir o fenótipo mesenquimal, sobretudo na borda da lesão com interface ao tecido estromal (Machado and Denadai 2013; Viana et al. 2013).

Além das mudanças fenótipicas associadas ao aumento de migração e invasão, alguns trabalhos sugerem que a EMT induz aparecimento de características de células-tronco, como potencial de auto renovação (*self-renewal potential*) que lhes permitem gerar as grandes populações de células que constituem metástases macroscópicas (Martin and Cano 2010). O subtipo de câncer de mama mais agressivo, classificados como *Basal-Like* (descrito a seguir), apresentam marcadores típicos de células mesenquimais, como por exemplo, a expressão de vimentina (Sarrió et al. 2008).

1.4. Invasão e metástase

A principal causa de mortes por câncer, sobretudo em câncer de mama, esta relacionada com o aparecimento de metástase, em que as células tumorais adquirem a capacidade de se espalhar para outros tecidos através do sistema linfático ou vasos sanguíneos (Coleman and Rubens 1987). A invasão para os nódulos linfáticos adjacentes é uma das primeiras indicações clínicas de tumores de mama que tem uma alta propensão para metástase (Goyal et al. 2008).

A disseminação de metástases propriamente dita é a última etapa de um longo processo desde a formação do tumor primário inicial. Como abordado anteriormente, a formação da membrana basal separando a unidade ducto-lobular terminal do estroma (Figura 1) é essencial não só para função, como também atua delimitando neoplasias benignas. Assim, o primeiro passo da geração de metástases é a invasão da lâmina basal feito ativamente populações de células da massa tumoral com adaptações fenotípicas que as conferem tal habilidade. Para a manifestação deste fenótipo, alterações em programas de expressão gênica como a EMT já foram sugeridas (Cheang et al. 2009).

As células dotadas desta capacidade invasiva possuem modificações no citoesqueleto que suportam projeções na base da membrana ricas em filamentos de F-actina chamadas invadopodia (Figura 4A) (Weaver 2006). Estas estruturas possuem a habilidade de degradar matriz extracelular (ECM) (Buccione et al. 2009) permitindo as células invadir através de membranas basais onde migram para os vasos sanguíneos e/ou linfáticos (Linder 2007). A formação e maturação da invadopodia são dependentes da sinalização via EGFR, seguida de ativação da Src kinase, e, decorrentes disso, a localização de proteínas regulatórias responsáveis

pela polimerização e ramificação dos filamentos de actina (Cdc42/N-Wasp/Cortactin) (Mader et al. 2011).

Quando N-Wasp é fosforilada neste complexo, torna-se ativa e recruta Arp2/3 para a nucleação das ramificações dos filamentos de F-Actina necessárias à gênese do invadopodia (Gligorijevic et al. 2012). Além dessa estruturação no citoesqueleto, o invadopodia necessita para a sua maturação da proteína MT1-MMP (também chamada Matrix metalloproteinase-14 - MMP14,) que desencadeia o processo de degradação da matriz extracelular (ECM) através da ativação de outras metaloproteinases (MMP2 e MMP9) secretadas pela célula maligna durante a invasão (CHEN and WANG 1999; Deryugina et al. 2001; Wang et al. 2004).

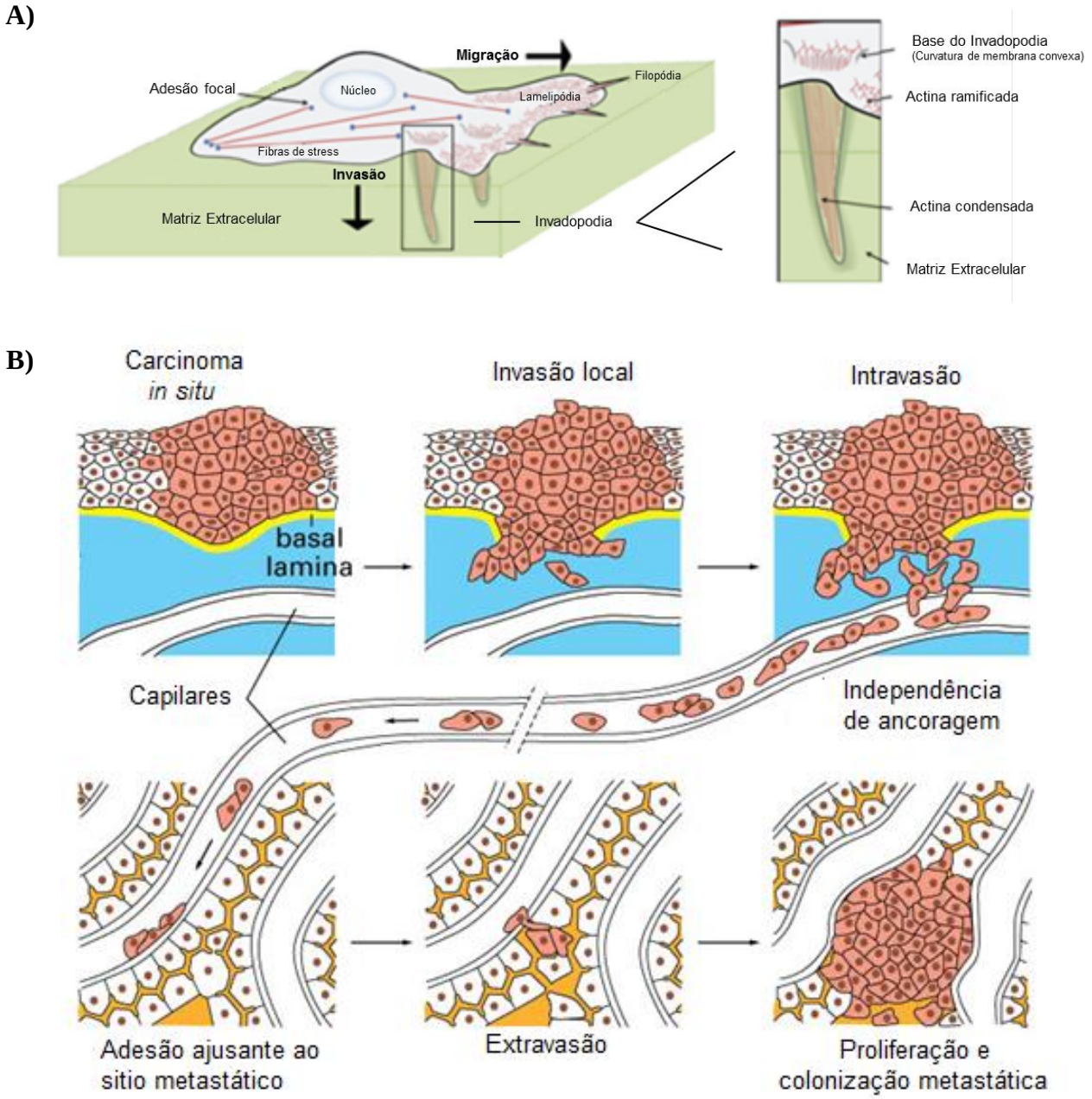


Figura 4. Da invasão local à disseminação de metástases. A) Esquema mostrando as protusões citoplasmáticas, lamelipodias, filopodias e invadopodia, e sua relação com os filamentos de actina do citoesqueleto. Em maior aumento é mostrada a estrutura do invadopodia, estrutura responsável pela digestão da lâmina basal durante a invasão celular. (Figura retirada com modificações de (Pichot 2010)). **B)** A disseminação de metástases esquematizada como um processo de múltiplas etapas (Figura retirada com adaptações de (Alberts 2007).

CIP4 (nome oficial do gene é *TRIP10*) é uma proteína adaptadora composta pelo domínio F-BAR (Fer/ CIP4 homology Bin/Anphiphysin/Rvs), envolvido no reconhecimento de membrana, pelo domínio HR1 (Cdc42-binding Homology Region 1) e o domínio SH3 (Src Homology 3) de reconhecimento a regiões ricas em prolinas em suas proteínas alvo. CIP4 reconhece regiões de curvatura na membrana através do domínio F-BAR, e recruta nesta região as proteínas efetoras Cdc42 ativada e N-Wasp, pelos domínios HR1 e SH3, respectivamente (Takano et al. 2008). Neste contexto, foi demonstrado que CIP4, quando fosforilada por Src, é direcionada ao invadopodia colocalizando-se simultaneamente com MT1-MMP e N-Wasp ativada (Hu et al. 2011). Além disso, foi demostrado que o silenciamento transiente de CIP4 reduziu o número de invadopodia em células invasivas MDA-MB-231, o que reduziu a capacidade migratória e invasiva dessas células in vitro (Pichot et al. 2010). Outras evidências mostraram que o silenciamento de CIP4 prejudica a disseminação de metástases em osteossarcoma, indicando que esta proteína atua como modulador positivo do processo metastático (Koshkina et al. 2013).

Deflagrada a etapa inicial, a invasão local, a geração de metástases ainda requer etapas adicionais, que estão brevemente ilustradas na figura 4B. As células invasivas ganham o lúmen dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos e migram para tecidos periféricos ao sitio primário (Wyckoff et al. 2000). Esta etapa é conhecida como intravasão e reflete outra habilidade celular adquirida que é a resistência à *anoikis*, sendo assim independentes da necessidade de ancoragem para sua sobrevivência. Após entrarem na circulação, caso sobrevivam a esta etapa, em algum momento essas células aderem o lúmen dos vasos, migram novamente para o ambiente estromal (ou parenquimatoso) do sítio metastático. Esta etapa, conhecida como extravasão, também é crítica para a formação de metástases (Miles

et al. 2008). As células que se adaptarem ao microambiente inóspito, muito diferente do tecido que foram originadas, podem colonizar e proliferar gerando assim o foco metastático (Habashy et al. 2010).

O processo desde a geração do tumor primário até a formação de metástases requer uma série de adaptações celulares e geralmente remete um longo tempo. Isso reforça a importância do diagnóstico precoce, para que haja redução da morbidade associada ao câncer de mama.

1.5. Graduação histológica e estadiamento do carcinoma mamário invasivo

O câncer de mama compreende um conjunto heterogêneo de neoplasias com evolução clínica diversa. Para garantir a conduta mais apropriada em cada caso, é necessária a classificação dos tumores de acordo com indicadores de prognóstico. Classicamente, esses indicadores surgiram da associação de achados clínicos, anatômicos e histológicos, com o histórico de evolução da doença neoplásica. Esses indicadores de prognóstico continuam sendo amplamente utilizados, embora tenham suas limitações, como discutido abaixo.

Na classificação dos carcinomas de mama, descrita pela *World Health Organization* (WHO), os tumores são divididos pelo tipo histológico (Lakhani 2012). A WHO descreve mais de 40 carcinomas mamários invasivos, entre tipos e seus subtipos. O **carcinoma ductal invasivo** (CDI) apresenta a maior ocorrência entre os tipos histológicos de carcinomas invasivos, com 50 a 80% dos casos, seguido pelo **lobular invasivo** (CLI), responsável por 5 a 15% dos casos (Weigelt et al. 2005).

A graduação histológica do carcinoma de mama é baseada no método de **SBR** (Scarff-Blom e Richardson) modificado (Elston and Ellis 1991), que é um método semiquantitativo que se baseia na somatória da pontuação em três fatores histológicos: **i)** a formação de túbulos e glândulas [maioria do tumor (>75%); quantidade moderada (10-75%); pouca ou nenhuma (<10%)], **ii)** o pleomorfismo nuclear (células pequenas, regulares e uniformes; variação moderada do tamanho do núcleo e marcada variação com a presença de nucléolos proeminentes) e **iii)** a contagem mitótica em 10 campos de grande aumento (essa, dependente da área de campo microscópico). Um valor numérico de 1 a 3 é atribuído para cada fator independentemente. A somatória dos três valores atribuídos para cada fator varia de 3 a 9, correspondendo finalmente ao grau histológico, assim designado: 3-5 pontos (grau 1, bem diferenciado); 6-7 pontos (grau 2, moderadamente diferenciado) e 8-9 pontos (grau 3, pouco diferenciado) (Bloom and Richardson 1957; Lakhani 2012; Osório 2013).

O estadiamento dos tumores mamários segue o sistema de classificação de tumores malignos (sistema TNM) (Sobin et al. 2011) Neste sistema, o estadiamento clínico é baseado em exames físicos e o diagnóstico por imagem. A letra "**T**" (tumor) refere-se à presença e extensão do tumor primário e é classificado em **T1**, **T2**, **T3** e **T4**, com tamanho menor ou igual a 2cm, entre 2 e 5cm, maior que 5cm, ou tumor de qualquer tamanho que apresente extensão direta à parede torácica ou à pele, respectivamente. A letra "N" (linfonodos) refere-se à metástase em linfonodos regionais, sendo: **N0** a ausência de metástases linfonodais regionais; **N1**, na presença de células tumorais em linfonodos axilares ipsilaterais móveis, níveis I e II axilares; como **N2**, na presença de células tumorais em linfonodos axilares ipsilaterais fixos, ou cadeia mamária interna ipsilateral, na ausência de evidência

clínica de metástase axilar; **N3**, na presença de células tumorais em linfonodos infraclaviculares (nível axilar III), linfonodos ipsilaterais da cadeia mamária interna (detectado por exame clínico ou por estudos de imagem), com evidência clínica de metástase axilar em níveis I e II, ou com metástase ipsilateral em linfonodo supraclavicular, com ou sem envolvimento de mamária interna. A letra "**M**" (metástases ou M) refere-se à presença de metástases à distância e pode ser classificado segundo a ausência ou presença de metástases em **M0** e em **M1**, respectivamente. (Rakha et al. 2010; Sobin et al. 2011; Lakhani 2012; Osório 2013).

1.6. Classificação de neoplasias mamárias baseadas em marcadores moleculares

A classificação dos tumores de acordo com critérios histológicos constitui uma importante ferramenta para rápida avaliação do prognóstico dos pacientes. Entretanto, tumores com histologias similares ou aparentemente idênticas, podem apresentar diferenças, ao nível molecular, intrínsecas a cada tumor. O que repercute em diferentes prognósticos, bem como em diferentes respostas clínicas quando aplicadas as mesmas terapias (Irvin and Carey 2008).

Essas diferenças moleculares entre tumores podem ser desde padrões de expressão gênica diferenciados, bem como a mudança de localização subcelular de determinadas proteínas regulatórias (Xu et al. 2013) ou ainda o *status* de modificações pós-traducionais, tais como fosforilações (Rush et al. 2005; Viatour et al. 2005), acetilações (Krueger and Srivastava 2006), sumoilações (Alarcon-Vargas and Ronai 2002) metilações (Krueger and Srivastava 2006) e etc. Essas modificações pós-traducionais regulam a atividade/função, como também podem

regular a localização subcelular dessas proteínas (Zha et al. 2000; Meek and Knippschild 2003; Krueger and Srivastava 2006). Tais características bioquímicas tem sido correlacionadas a agressividade dos tumores com o intuito de fornecer evidências preditivas da malignidade do neoplasma (Goncalves et al. 2006; Krueger and Srivastava 2006).

Cerca de 30% das pacientes que não apresentaram micrometástases em nódulos linfáticos, irão sofrer recorrência da neoplasia nos primeiros 5 anos após ressecção. Enquanto as outras 70% irão permanecer livres da doença (Subramaniam and Isaacs 2005). A decisão sobre o emprego de uma terapia sistêmica, bem como o tipo que será adotado após a remoção cirúrgica do tumor é ainda feita majoritariamente baseando-se em parâmetros histológicos clássicos. No entanto, o uso de marcadores moleculares vem sendo incorporados rapidamente à rotina clínica (Anders and Carey 2008). Determinadas formas de tratamentos somente surtirão efeito se aplicadas num contexto bioquímico condizente. Por exemplo, o uso de inibidor de receptores hormonais somente quando estes estão sendo expressos pela célula (Sorlie et al. 2001).

Dentre os principais marcadores moleculares já incorporados à rotina clínica podem ser citados os receptores hormonais de Estrógeno (ER) e Progesterona (PR) (Weigel and Dowsett 2010; Caldarella et al. 2011). A detecção imunohistoquímica positiva destes em carcinomas de mama é um marcador molecular estabelecido como indicativo de bom prognóstico, sendo utilizado ainda na predição ao tratamento (Rakha et al. 2010). Os antiestrogênicos, tal como o tamoxifeno, são inibidores competitivos de estrógeno e diminuem a atividade mitogênica nas células que expressam esse receptor (Paik et al. 2004). O uso de tamoxifeno como terapia adjuvante reduz significativamente as taxas de recidiva em pacientes portadoras de

câncer de mama que expressam esses receptores (Canon et al. 2012; Cardoso et al. 2013).

Outro importante marcador molecular na rotina clínica do câncer de mama é o receptor de EGF2 (HER2). Este gene é um dos quatro membros da família de receptores do fator de crescimento epidermal: EGFR (HER1/ERBB1); ERBB2 (HER2 ou HER2/ neu); ERBB3 (HER3); e ERBB4 (HER4). As proteínas dessa família são receptores transmembranares com domínio citoplasmático tirosina quinase e estão envolvidas com a transdução de sinais proliferativos e antiapoptóticos e com a ativação de vias como MAPK, PI3K/Akt e mTOR. Assim, elas podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral, sendo o gene HER2 o membro da família com maior importância para o câncer de mama . Em torno de 25 a 30% dos carcinomas mamários invasivos superexpressam a proteína HER2, especialmente devido à amplificação do gene HER2, o que confere um prognóstico mais agressivo (Weigelt et al. 2005; Piccart-Gebhart 2006; Taneja et al. 2010), com menores taxas de sobrevida (Pegram et al. 1998; Curtis et al. 2012). Na rotina clínica, a detecção da proteína HER2 é determinada por imunohistoquímica. Já para verificar a amplificação do gene, é empregada a técnica FISH (Wolff et al. 2007). A droga Trastuzumab, também conhecido como Herceptin®, é um anticorpo monoclonal que reconhece o domínio extracelular do receptor, impedindo sua dimerização e inibindo sua atividade de quinase (Vu and Claret 2012), ao passo que o Lapatinib inibe de domínios tirosina-quinase responsáveis pela transdução do sinal quando este receptor é ativado (Emde et al. 2012). O valor preditivo da expressão dos marcadores moleculares é maior em combinação, do que considerados individualmente (Rakha et al. 2009; Rakha et al. 2010).

Para a classificação dos tumores em subtipos de acordo com o *status* de receptores são considerados principalmente o receptor HER2 e os receptores dos hormônios Estrógeno e de Progesterona, separando os pacientes em 4 diferentes subtipos principais: *Basal-like*, HER2+, Luminal A e Luminal B (Sotiriou and Pusztai 2009). No subtipo *Basal-like*, que representa de 10% a 27% dos casos de câncer de mama (Rakha et al. 2008), os tumores deixam de expressar HER2 e os receptores de Estrógeno e Progesterona por isso também são chamados de triplos negativos (TNBC, do Inglês: *Triple Negative Breast Cancer*) (Lehmann et al. 2011). Geralmente este subtipo é o de pior prognóstico, frequentemente associado a uma grande massa tumoral, comprometimento linfonodal, resistência às quimioterapias convencionais e de comportamento biológico agressivo (Haffty et al. 2006; Rakha and Ellis 2009). Por outro lado, o subtipo Luminal A, que expressa o receptor de Estrógeno e/ou receptor de Progesterona, mas não expressa HER2, são os de melhor prognóstico; expressam baixos níveis de Ki67 e geralmente são lesões de baixo grau (Rakha et al. 2009; Habashy et al. 2012). O subtipo Luminal B expressa o receptor de Estrógeno e/ou receptor de Progesterona, além de HER2. Finalmente, o subtipo HER2+, que expressa o receptor para HER2, mas não os receptores ER e PR (Rakha et al. 2009; Habashy et al. 2012). Esta classificação é útil para predizer o prognóstico, bem como direcionar terapias, como por exemplo, o uso das terapias hormonais (Perou et al. 2000; Lehmann et al. 2011). Além disso, pode ser útil em pesquisa ao categorizar os tumores e transpondo-os para modelos de linhagens celulares de mama com fenótipos semelhantes (Marangoni et al. 2007; Irvin and Carey 2008).

Além desses marcadores clássicos, a expressão de outros genes têm sido implicados ao prognóstico do câncer de mama, como os marcadores de progressão

do ciclo celular como ki-67 e PCNA (Subramaniam and Isaacs 2005) e outros como p53, p14ARF, ciclina D1, ciclina E, TBX 2/3, BRCA1/2, VEGF e o ativador de plasminogênio da uroquinase (uPA) (Duffy and Duggan 2004; Esteva and Hortobagyi 2004; Anders and Carey 2008). Os genes expressos durante a EMT também estão apontados como marcadores moleculares, como a expressão de Vimentina, Claudinas e Citoqueratinas (CKs) (Rakha et al. 2010). De forma que as medidas de expressão destes foram incorporadas na classificação dos subtipos moleculares previamente descritos. As Citoqueratinas 8 e 18 são típicas dos subtipos luminais (A e B), enquanto que as Citoqueratinas 5, 6 14 e 17 expressas no subtipo *Basal-like,*(Yu et al. 2009) além da diminuição da expressão de Claudina (Low-Claudins) (Prat et al. 2010; Badve et al. 2011)

1.7. Análise de expressão gênica em tumores de mama em larga-escala utilizando microarranjos de DNA

O valor preditivo de marcadores de prognóstico do câncer de mama quando utilizados individualmente é limitado. Além disso, quando avaliados em análises multivariadas, o valor prognóstico de muitos desses biomarcadores perde a significância (Howat et al. 1983; Battaglia et al. 1988; Sørlie et al. 2001). A heterogeneidade celular e molecular de tumores de mama e o grande número de genes potencialmente envolvidos nos fenótipos tumorais, incluindo genes codificadores para proteínas que controlam o crescimento celular, a morte e diferenciação celular, ressaltam a importância de se estudar várias alterações genéticas simultaneamente. A investigação sistemática dos padrões de expressão de milhares de genes em tumores usando microarranjos de cDNA, e sua correlação com parâmetros clínicos relevantes, encontrados tem permitido a identificação de assinaturas de expressão gênica associadas aos subtipos moleculares de tumores

(Golub et al. 1999; Perou et al. 2000). Sinergicamente, os genes expressos de forma concomitante, contribuem para a manifestação do fenótipo intrínseco ao subtipo específico.

A análise dessas assinaturas de expressão de amostras de tumores de pacientes com informação de seguimento temporal tem sido empregada para a identificar subconjuntos de genes com valor preditivo de evolução clínica. Esta abordagem, tem sido largamente utilizada para a triagem de biomarcadores de malignidade no câncer de mama (Perou et al. 2000; Sorlie et al. 2001; van 't Veer et al. 2002; van de Vijver et al. 2002).

Van´t Veer e colaboradores identificaram genes preditivos de surgimento de metástases de mama fazendo uso de uma plataforma de microarranjos de DNA que interrogava 25.000 genes (van 't Veer et al. 2002). A análise do padrão de expressão de um subconjunto de cerca de 70 genes revelou-se capaz de estratificar pacientes em função da probabilidade de desenvolvimento de metástases após a remoção cirúrgica do tumor primário. O poder preditivo dessa assinatura foi validado em estudos multicêntricos envolvendo um grande número de pacientes (van de Vijver et al. 2002; Ein-Dor et al. 2005; Bueno-de-Mesquita et al. 2009) e hoje compõe um kit de prognóstico molecular disponível comercialmente com o nome de Mammaprint® (Agendia Inc.). Atualmente, estão disponíveis comercialmente outros kits para prognóstico molecular do câncer de mama desenvolvidos a partir de estudos de expressão gênica em larga-escala, como o Oncotype DX (Genomic Health, Inc.) e Theros H/I (AvariaDx Inc.)

Um estudo prévio realizado em nosso laboratório (Canevari et al., dados não publicados) buscou identificar novos marcadores de prognóstico de câncer de mama

utilizando amostras de pacientes bem acompanhadas e com seguimento clínico conhecido. Neste estudo foi utilizada a plataforma de microarranjo de DNA *Codelink Whole Human Genome* (*GE Healthcare)*. As lâminas *Codelink* contem cerca de 57 mil sondas, na forma de oligonucleotídeos com 30-mer depositados em uma matriz de gel tridimensional (Nakaya et al. 2007). As 57.000 sondas representadas nas lâminas Codelink são complementares à sequencia de mRNAs de genes bem anotados no genoma humano, além de ESTs, sendo portanto capazes de interrogar a expressão de um número de transcritos significativamente superior aos 25.000 usados por Van’t Veer (van 't Veer et al. 2002). Neste estudo foram analisados perfis de expressão gênica de um conjunto de amostras de tumores primários de casos de carcinoma ductal invasivo, selecionadas do Banco de Amostras do Laboratório NeoGene, Depto de Urologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP e provenientes da Fundação Hospital Amaral Carvalho, Depto de Mastologia (Jaú – SP), após a obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido e da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do referido Hospital.

De posse da evolução clínica das pacientes, foi realizada uma análise supervisionada para identificar uma assinatura de expressão gênica capaz de distinguir pacientes em função do surgimento de metástases em um período de 60 meses após a mastectomia. Foi identificada uma assinatura de expressão gênica com 60 transcritos capaz de discriminar grupos de pacientes que desenvolveram ou não metástases no período pós-operatório de 5 anos (Figura 5).

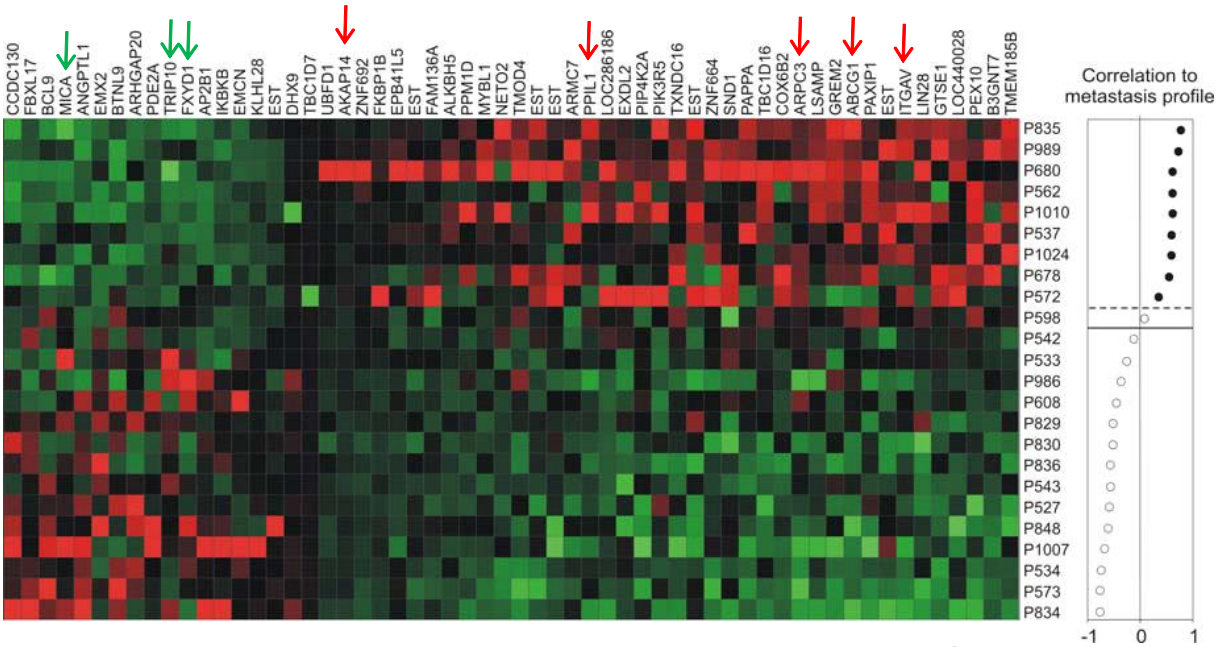


Figura 5. Genes diferencialmente expressos entre tumores primários de pacientes com câncer de mama que apresentaram ou não metástase. Gráfico de *heat map* mostrando o padrão de expressão gênica de um conjunto de 60 transcritos que apresentam expressão diferencial entre amostras de tumores de mama de pacientes que desenvolveram (painel da direita, círculos cheios) ou não (painel da direita, círculos vazios) metástase ao longo de pelo menos 5 anos após a remoção do tumor.

A partir desses resultados, selecionamos 8 genes candidatos a marcadores de prognóstico, principalmente no que refere ao desenvolvimento de metástases. A escolha destes pautou-se tanto nas diferenças de expressão, evidenciadas evidências pelo experimento de microarranjo de DNA, bem como em evidências apontadas na literatura de envolvimento destes com processos celulares relacionados ao processo metastático. A tabela 1 resume esquematicamente os genes elencados como potenciais marcadores de prognóstico no câncer de mama de acordo com a localização subcelular, vias de sinalização envolvidas e possíveis papeis celulares (Ponten et al. 2008). Como muitos destes candidatos foram descartados da análise após experimentos iniciais de validação, por razões de espaço e concisão, optamos por descrevê-los com maiores detalhes nas seções no item ANEXO.

Tabela 1. Descrição dos genes candidatos selecionados para caracterização neste trabalho.

Símbolo	Entrez gene name	Localização subcelular	Vias de sinalização	Função na célula
TRIP10 (Cip4)	Thyroid hormone receptor interactor 10	Membrana plasmática, periferia celular, microtubulos e núcleo	CDC42 (RhoGAP) e Src.	Organização e polimerização do citoesqueleto, citotoxicidade e morte celular
FXYD1	FXYD domain containing ion transport regulator 1	Membrana plasmática, núcleo	Bombas de Na+/K+ ATPase, fosforilada sob estímulo adrenérgico e insulina	Bombas de efluxo. Crescimento celular
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	Membrana plamastica, citoplasma e pode ser secretada	*Crosstalk* entre células dendriticas e *Natural Killer*	Resposta ao dano no DNA, resposta a reconhecimento celular e citotoxicidade
AKAP14	A kinase (PRKA) anchor protein 14	Axonemas, cilios, citoplasma e núcleo (Sobretudo em células mucociliares)	Sinalização mediada por cAMP, sinalização β-adrenergica, Insulina, sinalização via Proteina Kinase A	Transdução de sinais. Possivelmente envolvido em apoptose.
ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Membrana apical e basolateral, borda celular, vesículas citoplasmáticas, adesão focal e fração de *rafts* de membrana resistente a detergentes e/ou pH	Sinalização de Integrina; Sinalização de endocitose mediada por Caveolina; NF-κB; Akt;	Adesão, ligação, migração, proliferação apoptose, invasão, crescimento, mobilidade e sobrevivência
ABCG1	ATP-*binding cassette*, subfamília G (WHITE), membro 1	Superfície celular, membrana plasmática, complexo de golgi e do retículo endotelial	Função inibitória mediada por LPS/IL-1;	Metabolismo lipídico. Efluxo de toxinas (quimioterápicos)
PPIL1	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilins) like1	Spliceossomos, citoplasma	Envolvida no *splicing* de RNA	Atividade de isomerase cis-trans de prolina. Dobramento de proteínas
ARPC3	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa	Cauda de actina, vesículas *clathrin-coated*, lamellipodia, nucléolo	RhoA Signaling, Ramificação de filamentos de actina. Sinalização de endocitose mediada por Cla*thrin*	Migração celular, polimerização de filamentos de actina ao movimento celular

1.8. Microarranjos de tecido como ferramenta de validação de marcadores de prognóstico

A progressão tumoral é orquestrada por mudanças no padrão de expressão gênica que se correlacionam às etapas da progressão tumoral (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011). Conhecer os genes que orquestram este fenômeno, bem como mensurar sua expressão, é de suma importância para predizer o grau de malignidade dos tumores de mama. Ferramentas de análise de expressão gênicas em larga escala são úteis para este propósito. No entanto é necessário correlacionar as medidas dos níveis de expressão medidos em transcritos (RNAs), como os medidos por microarranjos de DNA por exemplo, com os níveis das proteínas propriamente ditas (Schraml et al. 1999). Uma vez que em nosso estudo foram considerados apenas genes codificadores de proteínas, empregamos microarranjos de tecidos (do inglês *Tissue Microarrays*, TMAs) para a validação da expressão proteica nas pacientes. Esta transposição de tecnologias (microarranjo de DNA para TMA) é bastante utilizada, pois permite o acesso a um grande número de amostras com acompanhamento clínico conhecido e é facilmente transponível para a rotina de um laboratório de patologia molecular (Ludwig and Weinstein 2005). Avaliar a expressão de proteínas utilizando técnicas imunohistoquímicas em larga escala permite a identificação e validação de diferentes genes candidatos como diferencialmente expressos de forma simultânea (Ludwig and Weinstein 2005; Berglund et al. 2008).

As lâminas de TMA são confeccionadas de forma a permitir arranjos contendo coleções de amostras provenientes de vários de pacientes com diferentes estádios clínicos. O uso de TMAs permite obter dados em paralelo de um grande número de amostras, e assim estabelecer a importância do candidato com valor diagnóstico,

prognóstico ou terapêutico. Além disso, devido à condensação de centenas de casos numa mesma lâmina de TMA, o processo de coloração por imunohistoquímica torna-se simplificado e uniforme. O que representa economia de reagentes e diminuição no tempo de execução. Entretanto, a principal vantagem é a redução de viéses decorrentes de diferentes colorações, uma vez que todas as amostras são executadas simultaneamente com as idênticas condições. Isso repercute em mesmos tempos de incubação, lavagens, diluições de anticorpos e tempos de exposição aos cromógenos (DAB) ocasionando em medidas mais próximas do real e facilmente comparáveis (Schraml et al. 1999; Camp et al. 2000).

No câncer de mama, poucos marcadores são utilizados na rotina clínica. Os receptores de hormônios, ER e PR, HER2+ são os mais empregado. Além disso, alguns centros também utilizam os marcadores de proliferação (ki67 e PCNA) e marcadores basais como as citoqueratinas CK5/6 (Rakha et al. 2009). Os estudos feitos com TMAs tem indicado muitos biomarcadores como promissores, Ciclina D.e E, Catepsina D, uPAR mas no entanto ainda existem limitações na implementação destes possíveis biomarcadores na rotina clínica (Esteva and Hortobagyi 2004; Ludwig and Weinstein 2005).

Apesar dessas limitações para aplicação na clínica, os estudos com TMAs são úteis para apontar proteínas a serem investigadas bioquimicamente, onde o mecanismo de ação dessas proteínas na tumorigênese ou manutenção/progressão dos tumores pode ser dissecado através de ensaios funcionais, por exemplo, através da depleção ou super-expressão dessas proteínas *in vitro* utilizando culturas de linhagens de células humanas.

1.9. O uso de linhagens celulares como ferramenta de estudo funcional de genes no câncer de mama

Uma parte considerável do conhecimento consolidado sobre o câncer de mama advém de estudos *in vivo* ou *in vitro* feitos com linhagens celulares de câncer de mama (do Inglês*: Breast cancer cell: BCC*) (Lacroix and Leclercq 2004). Dentre as potencialidades podem ser citadas a facilidade de obtenção de material, uma vez podem ser propagadas utilizando-se meios de cultura relativamente simples. O fato de estarem livres de elementos estromais pode representar algumas vantagens para determinadas abordagens, mas por outro lado, isso pode acarretar limitações a depender do foco do estudo (Lacroix and Leclercq 2004). Neste trabalho, utilizamos linhagens derivadas de tumores de mama em ensaios para avaliar fenótipos associados ao potencial metastático após o silenciamento de genes candidatos utilizando RNA de interferência.

A obtenção de culturas de células primárias de câncer de mama a partir de tumores em pacientes é pouco eficiente. De fato, o número de linhagens celulares obtidas de tumores não é muito alto. A maioria das linhagens de câncer de mama estabelecidas em cultura é proveniente de efusão pleural. Dessa forma, são obtidas muitas células individuais, com boa viabilidade e ausência de contaminação estromal (Cailleau et al. 1978). A maioria destas linhagens foi obtida no final da década de 1970. Poucas delas, como MCF7, T47D e MDA-MB-231 são responsáveis por mais de dois terços dos artigos que utilizam as linhagens *BCC*, como estima o base do *Medline* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/) (Lacroix and Leclercq 2004).

Neste trabalho, empregamos 4 linhagens de mama que representam diferentes estágios da progressão tumoral: MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 e HS578T (Figura 6). A linhagem MCF10A foi estabelecida a partir de uma desordem fibrocística em uma paciente que não apresentava câncer de mama. Dessa forma, representa um tecido não maligno e seu cultivo depende da adição de diferentes fatores de crescimento, como EGF e outros presentes no soro de cavalo. É uma linhagem que apresenta marcadores epiteliais clássicos, além de morfologia característica preservando junções célula-célula (Soule et al. 1990). A linhagem MCF7, apesar de tumoral e isolada de efusão pleural, ainda apresenta fenótipo luminal/epitelial. A morfologia destas células é epitelial apresentando crescimento em blocos de células com estreitas interações entre si. Expressa os receptores de Estrógeno e Progesterona, o que permite sua classificação como Luminal, além de apresentar marcadores epiteliais como E-caderina (Soule et al. 1973). Por outro lado, as linhagens MDA-MB-231 e HS578T são representativas de células mesenquimais com alto potencial metastático Nessas células é encontrado um perfil de marcadores mesenquimais como a expressão de vimentina, SLUG e perda da expressão de E-Caderina, bem como ausência de receptores de estrógeno e progesterona sendo assim caracterizada como *Basal-like* (Hajra et al. 2002; Lacroix and Leclercq 2004).

O conhecimento do perfil de expressão molecular dessas linhagens traz uma série de vantagens para o estudo de marcadores moleculares. Idealizamos para este trabalho utilizar as linhagens tumorais de mama como modelos para investigar a expressão e função dos genes candidatos em diferentes fundos genéticos. Nossa hipótese é que linhagens celulares tumorais e amostras clínicas classificadas com sendo do mesmo subtipo molecular apresentam semelhanças fenotípicas. Esse

aspecto foi considerado na interpretação de dados obtidos a partir de ensaios de detecção da expressão dos candidatos nas células e em amostras clínicas de tumores e ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo* para avaliar o papel dos genes candidatos no processo de metástase.

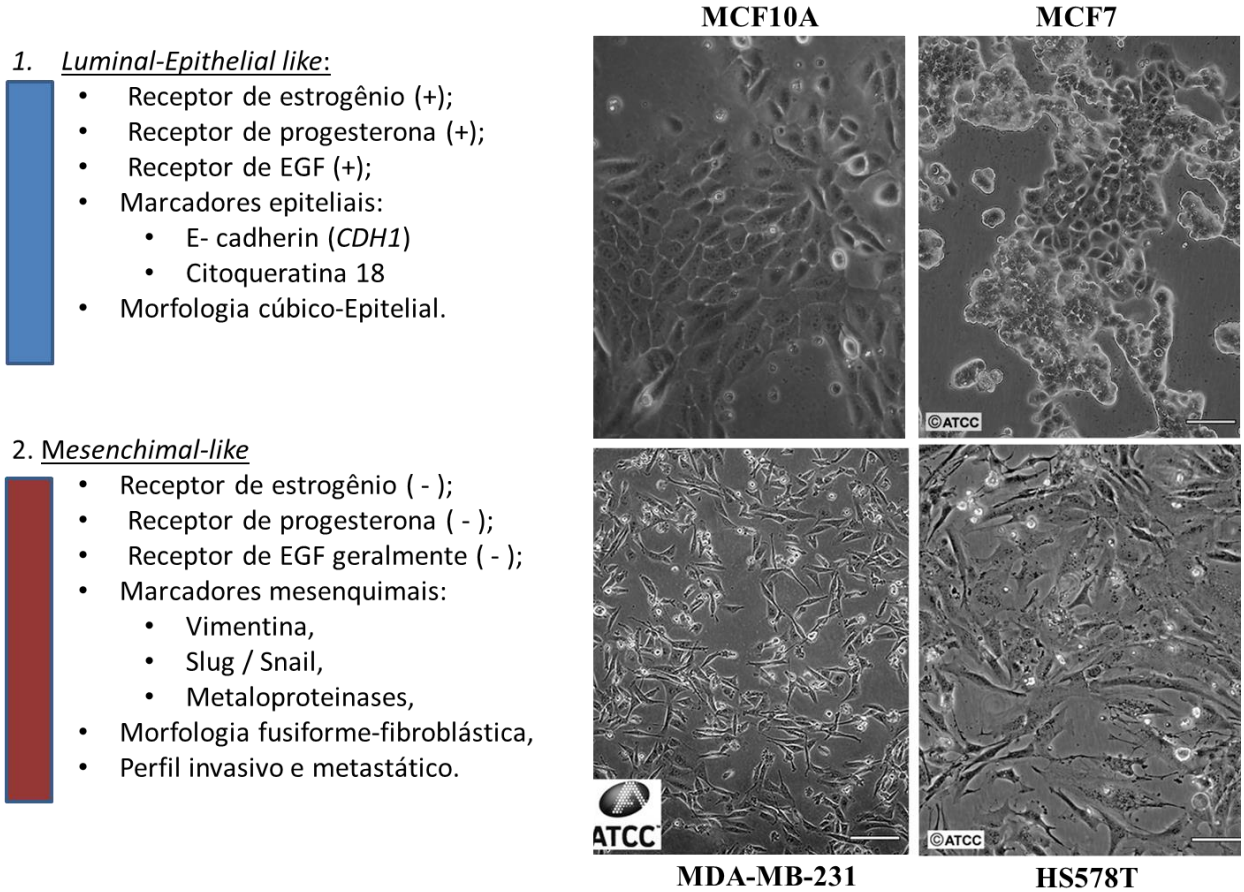


Figura 6. Classificação das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas segundo parâmetros de transição epitelial-mesenquimal (EMT). Quadro destaca as principais características fenotípicas das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas neste trabalho. No primeiro tipo, as células *Luminal-Epithelial like*, além de expressarem marcadores típicos de células epiteliais (destacados em azul), apresenta morfologia cúbico-epitelial com amplo contato entre as células. A linhagem MCF10A é representativa de tecido mamário não-tumoral, enquanto que a linhagem MCF7 representa células tumorais, mas não metastáticas. No segundo tipo, as Mesenchimal-like, expressam marcadores mesenquimais (destacados em vermelho) e exibem morfologia fusiforme-fibroblástica tendo suas células pouco contato umas com as outras. Estas linhagens são representativas de células tumorais com potencial invasivo e metastático.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Avaliar candidatos a marcadores moleculares para prognóstico do carcinoma de mama utilizando microarranjos de tecido *(Tissue Microarrays - TMAs)* contendo amostras de pacientes;
- Caracterizar funcionalmente o produto do gene CIP4 em relação ao seu papel na metástase de tumores de mama.

2.2. Objetivos específicos

- Validar o potencial prognóstico no câncer de mama de oito candidatos (TRIP10 (CIP4), FXYD1, MICA, AKP14, ITGAV, ABCG1, PPIL1 e ARPC3) selecionados a partir de estudo prévio de expressão gênica;
- Avaliar o potencial da imunomarcação dos candidatos no prognóstico do câncer de mama através da análise de curvas de sobrevida e tempo de desenvolvimento de metástase;
- Analisar a expressão de CIP4 em linhagens celulares derivadas de tumores de mama com diferentes graus de malignidade utilizando RT-qPCR e *western blot*;
- Caracterização funcional de CIP4 através de seu silenciamento em linhagens de mama seguido das seguintes análises fenotípicas:
    - Potencial migratório e invasivo *in vitro,*
    - Potencial de geração de metástases *in vivo,*
    - Investigação de vias de transdução bioquímicas envolvidas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e meios de cultura

Foram utilizadas linhagens celulares provenientes do tecido mamário de diferentes estágios clínicos e perfis de agressividade (tabela 2). As linhagens foram cultivadas segundo o protocolo recomendado pela ATCC. As células MCF10A foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco), 20 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de toxina colérica,10 ug/ml de insulina 500 ng/ml de hidrocortisona e antibióticos (penicilina e estreptamicina). As linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e HS578T foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1,2 g/L de bicarbonato de sódio, 25 mg/L de ampicilina e 100 mg/L de estreptomicina. Em todas as condições supracitadas, foi utilizada atmosfera com 5% de CO_2 a 37 °C. O subcultivo foi feito sempre em fase exponencial de crescimento celular de acordo com as peculiaridades de cada linhagem.

3.2. *Western blot*

As células em cultura foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas em PBS contendo 5mM EDTA, 1mM Na3VO4, 1,5mM NaF e coquetel inibidor de proteases. O material foi raspado da superfície da placa com o auxílio de *scrapers* estéreis e descartáveis, sendo coletado e centrifugado a baixa rotação (1200 rpm). O precipitado de células foi finalmente lisado com tampão RIPA (50 mM Tris pH 7,4, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1mM Na3VO4, 10 mM NaF, 10 mM beta-glicerofosfato, 1 mM EDTA pH 8,0, 1mM EGTA, inibidores de protease). O extrato proteico assim obtido foi fervido em tampão de

amostra redutor e separado em gel SDS-PAGE de 10 a 12% de acordo com o tamanho da proteína. Este gel foi transferido para membrana de PVDF e a bloqueada por 30 minutos em PBS-leite desnatado 5%. Os anticorpos primários foram incubados no mesmo tampão de bloqueio *overnight* a 4 °C. A membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos com PBS-Tween 0,1% e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma) foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente em PBS- leite desnatado 5%. Após a lavagem na membrana como acima descrito, esta foi incubada com solução para quimioluminescência (kit "ECL *Western Blotting Analysis System*" (Pierce) e exposta a filmes de raio-X (Kodak). As medidas de densitometria das bandas foram feitas com o programa ImageJ. As bandas relativas às proteínas a serem quantificadas foram selecionadas e os valores da densitometria foram normalizadas pelas bandas de actina da mesma membrana a ser analisada.

3.3. Imunofluorescência

A reação de imunoflurescência seguiu os seguintes passos: (1) fixação com 2% de parafolmaldeído (PFA); (2) permeabilização com PBS+ 0.5% de Triton X-100; (3) bloqueio com PBS + 0,2% de Triton X-100 + 0,05% de Tween 20 + 0,1% BSA + 10% soro de cabra + anti-IgG de camundongo (fragmento Fab); (4) incubação com anticorpos primários e anticorpos secundários conjugados a fluoróforos (Molecular Probes) em solução de bloqueio; (5) análise da coloração por microscopia confocal.

3.4. PCR em Tempo Real

As linhagens celulares tiveram seu RNA extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) conforme descrito pelo fabricante e purificados com o kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen), incluindo tratamento com DNase (Turbo DNase - Ambion) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico. A qualidade do RNA foi analisada através de um ensaio de eletroforese capilar utilizando Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), no qual a integridade do RNA é medida pela relação entre as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. A quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA extraído foi feitas através da medida da absorbância a 260/280nm (avalia contaminação com proteínas) e a 260/230nm (avalia a contaminação com grupos fenólicos resultantes do processo de extração/purificação) utilizando o espectrofotômetro capilar Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Os experimentos de PCR quantitativo em tempo real foram precedidos por uma etapa de transcrição reversa (utilizando como *primer* hexameros aleatórios ou oligos dT) para, então, medir-se a quantidade de cDNA de interesse presente nas células tumorais. A reação de transcrição reversa foi feita com o kit *Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen), de acordo com o protocolo padrão do fabricante. A quantificação relativa dos transcritos de *CIP4* foram feitos utilizando-se o reagente *SYBR Green PCR Master Mix* de acordo com o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*). Foram utilizados os *primers* Fw: TGAACGGCTGAAATTGGAAGT e Rv: GTCTCCCCGGTTGCTAAGG específicos

para diferentes exons do mRNA de *CIP4*, gerando um amplicon de aproximadamente 100pb somente se o RNA encontrar-se totalmente processado.

3.5. Produção de partículas lentivirais para silenciamento gênico por *short hairpin RNAs* (shRNAs).

As partículas lentivirais recombinantes foram produzidas por transfecção transiente de células HEK293T. Estas células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). Para a transfecção, foram plaqueadas $2x10^6$ células em placas de 100 mm. No dia seguinte, as células foram transfectadas com 4 µg de DNA do vector pTRIPZ vazio ou shRNA específico para CIP4), 3 µg de pAX e 1,2 µg de pMD2G-VSVG utilizando Fugene (Roche) de acordo com as recomendações do fabricante. Após 6 horas de transfecção, o meio foi trocado e o meio contendo os lentivírus recombinantes foram colhidas em duas alíquotas, após 24 e 48 horas. Este sobrenadante foi submetido a filtração com poros 0,45 µM para retirada da células em suspensão ou seus detritos. As células alvo MDA-MB-231, que haviam sido previamente semeadas em placas de 60 mm em baixa confluência, receberam 1mL deste meio condicionado (contendo em partículas lentivirais em suspensão) num total de 3 mL de volume final. Após a segunda incubação de 24 horas, foi feita a seleção das células transduzidas utilizando puromicina (2 µg/ml). Finalmente, as células sobreviventes (transduzidas) foram induzidas com Doxiclina e fotografadas em microscópio de epifluorescência para verificação da expressão do gene repórter Turbo-RFP. Detectou-se que quase a totalidade das células expressavam o gene repórter, estando portanto transduzidas com o vetor lentiviral.

3.6. Ensaios de migração e invasão *in vitro*

O potencial invasivo das linhagens celulares das linhagens tumorais de mama após silenciamento de CIP4 foi analisado através de ensaios de invasão e migração *in vitro.* Nestes foram utilizadas placas do tipo *transwell*® (*Corning*) acrescidas ou não de uma camada de Matrigel, que serve de substrato para invasão. O ensaio foi feito em placas de 12 poços contendo plataformas de membrana de policarbonato porosa de 12 mm de diâmetro com poros de 8 µm. As células foram previamente privadas de soro (DMEM sem soro) por aproximadamente 12 horas. Nestas condições, foram acrescentadas aproximadamente 5 x 10^4 células sobre membranas previamente revestidas com Matrigel (aproximadamente 400 µg/cm^2) ou não, para que então fossem feitas as análises de invasão (com matrigel) e migração celular (somente membrana porosa). No compartimento inferior de cada poço individualmente, foi adicionado 500 µl de meio de cultura contendo 10% de soro e quimio-atrativos para adesão/migração que se difundem livremente através da membrana. Após 24 horas de incubação, a plataforma contendo a membrana foi lavada com PBS e as células fixadas com PFA 4%. Posteriormente, estas plataformas foram lavadas e as células nela aderidas coradas com DAPI. As células da parte superior são delicadamente retiradas com o auxílio de hastes de algodão flexíveis (cotonetes). As células aderidas na parte inferior da membrana correspondem àquelas que invadiram o Matrigel ou, na ausência deste, migraram através dos poros da membrana. Ambas foram fotografadas num microscópio de epifluorecência e quantificadas com o *software* ImagePro.

Outra medida de migração foi feita pelo ensaio de *wound healing*. Este foi realizado conforme já descrito por Rodriguez e colaboradores (Rodriguez et al. 2005). De maneira resumida, as células foram semeadas em placas de 6 poços e,

ao atingir confluência total, feito um risco (*scratch*) na camada de células com o auxílio de uma ponteira p200 estéril. As células foram então lavadas duas vezes com PBS e fotografadas antes do reestabelecimento do meio de cultura utilizado (Tempo 0). Após 12 horas, as mesmas regiões da placa foram novamente fotografadas (Tempo final). A diferença entre as áreas corresponde à área de migração foi calculada com o *software* ImagePro.

Os ensaios de invasão em cultura tridimensional utilizaram um sistema de placa de 96 poços específica de fundo em U onde a matriz extracelular (Matrigel) empregada favorece a agregação celular e/ou formação de esferoides no fundo do poço (Cultrex® 3-D Spheroid Cell Invasion Assay, Trevigen INC.) Após 3 dias de cultura e formação dos esferóides, uma nova camada de matriz extracelular contendo quimioatrativos (soro fetal bovino) é aplicada sob a camada anterior. Após 6 dias de cultura nessas condições, os esferoides são examinados em microscópio e as imagens coletadas analisadas com o *software* ImagePro (Vinci et al. 2012).

3.7. Tumorigênese e potencial metastático *in vivo*

Camundongos (BALB/c) *knockout* para os genes Rag2 e γc são deficientes em células NK, B e T, e foram descritos como um modelo para a detecção e quantificação de metástases pulmonares, proveniente de xeno-enxertos ortotópicos, com MTLn3 e outras células tumorais geneticamente modificadas (Le Devedec et al. 2009). O laboratório do Prof. Dr. Andrew Craig utiliza-se de uma *facility* que aloja os animais em ambiente com intensidade luminosa controlada, livre de patógenos, com gaiolas ventiladas, alimentos e água esterilizados. (*Queen University Animal Care Services*). O laboratório possui certificação dos procedimentos com animais, que

foram devidamente aprovados pelo comitê de ética e de cuidado em experimentação animal da instituição. Foram utilizadas as linhagens MDA-MB-231_TRIPZ e MDA-MB-231-shCIP4. As células foram cultivadas até à confluência 70-85% antes da tripsinização e contagem. Para a formação de xeno-enxerto, as células foram injetadas em *fat pads* do tecido mamário torácico direito de fêmeas $Rag2^{-/-}.\gamma c^{-/-}$ jovens. Foram utilizadas 1,5 $x10^6$ células das linhagens MDA-MB-231_TRIPZ e MDA-MB-231-shCIP4. O volume a ser inoculado foi ajustado para volume final de 50 µL com 50% de Matrigel, sendo a injeção realizada com uma seringa hipodérmica. Passadas 4 semanas do inóculo, os animais foram eutanasiados e a massa do tumor primário então registrada. Os pulmões foram dissecados e excisados, lavados com PBS gelado, colocados sobre uma lâmina de microscópio e fotografados a fresco com um microscópio de epi-fluorescência (objetiva de 4X). Os tumores primários e as metástases pulmonares de cada animal foram encaminhados para análise histológica. As amostras foram fixadas em formalina e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com H&E para análise histológica e contagem das metástases pulmonares. Para investigar etapas tardias da formação de metástases em pulmões, as células foram injetadas pela veia caudal fêmeas de $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$. Após 2 semanas, os animais foram sacrificados, e os pulmões removidos e submetidos a análise histológica, bem como quantificação fluorescente de metástases TurboRFP positivas.

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA). Para a análise de dados em relação a uma variável apenas, utilizou-se a análise de variância dos dados das populações seguido por t-test não paramétrico (Mann-Withney test). Para análise considerando duas variáveis, os dados foram avaliados por análise de variância ANOVA, seguido do teste de hipóteses de Tukey.

3.9. Experimentos com *Tissue Microarrays*

3.9.1. Casuística

Foram utilizados neste trabalho 4 blocos de *Tissue Microarrays* (TMA) contendo 1167 casos de pacientes femininas com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama e diferentes graus histológicos e estádios clínicos selecionados a partir dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. A montagem destes blocos de TMA foi feita durante a tese de doutorado de Mônica Maria Ágata Stiepcich, aluna do Prof. Dr. Fernando Augusto Soares do referido Departamento, em 2007. Após uma busca e análise de informações clínicas desses pacientes, decidimos selecionar um subconjunto de 292 pacientes. Dentre os critérios de seleção desses pacientes, pode-se citar a presença de área representativa de lesões invasivas superiores a 10% da área total do *spot*. Foram excluídos casos com lesão *in situ* apenas, além de *spots* gastos ou inexistentes. Além disso, foram excluídos pacientes que receberam quimioterapias neo-adjuvantes, pois, nestes pacientes a presença dos quimioterápicos poderia mudar o padrão de expressão gênica e assim interferir nas medidas de expressão de CIP4.

Outro importante critério de seleção foi incluir apenas pacientes com metástases distantes, ou seja, todos os pacientes que apresentaram recaída foram necessariamente acometidos pela formação de metástases em sítios diferentes da mama, ou seja, metástase óssea, pulmonar, hepática e assim por diante. Assim, os 292 pacientes que se enquadraram nesta seleção foram incluídos para este estudo.

3.9.2. Reação de imunohistoquímica

Os experimentos com TMAs foram realizados em colaboração com o Dr. Fernando Soares, do Hospital AC Camargo. Para a montagem dos *Tissue arrays*, seções cilíndricas com 5 mm de espessura de blocos de parafina provenientes de biopsias de amostras de pacientes selecionados foram cortadas e montadas ordenadamente em blocos de parafina. A imunohistoquímica para a detecção das proteínas candidatas foi realizada conforme descrito anteriormente (Sharp et al. 1999). Resumidamente, cortes dos TMAs aderidos em lâminas de vidro e imersos em xilol para remover a parafina. Após a reidratação, as peroxidases do tecido foram bloqueadas com uma solução de peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas foram tratadas com proteinase K e bloqueadas antes da adição do anticorpo primário de interesse. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, foram feitas lavagens com PBS. Em seguida, os TMAs foram incubados por 30 minutos com anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Novas lavagens com PBS foram feitas para retirada dos anticorpos não ligados e a seguir foi feita a detecção com DAB (diaminobenzidina) por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e examinadas num microscópio ótico (Carl Zeiss) acoplado a câmara fotográfica e em seguida escaneadas pelo aparelho Aperio. As proteínas expressas pelos genes candidatos foram evidenciadas por coloração amarronzada típica conferida pela imunodeposição do DAB.

Tabela 2. Anticorpos utilizados nos experimentos de TMA.

#	Anticorpo	Marca	# catálogo	Controle Positivo		Diluição utilizada		Peso molecular	Natureza
				IHC	Linhagem celular	IHC	WB	(kDa)	
1	ABCG1	ABCAM	ab52617	Carcinoma cervical	HUVEC	1:50	1:200	110	Rabbit monoclonal
2	MICA	ABCAM	ab93170	Hepato-carcinoma	MDA-MB-231	1:50	1:100	43	Rabbit polyclonal
3	P21-ARC (ARPC3)	ABCAM	ab96137	Endometrio	293T, HepG2	1:100	1:300	21	Rabbit polyclonal
4	FXYD1	ABCAM	ab76597	Cérebro	A-431	1:100	1:500	10	Rabbit polyclonal
5	CIP4 (TRIP10)	SantaCruz	sc-166810	Estômago	JAR	1:200	1:1000	75	Mouse monoclonal
6	CD51 (ITGAV)	SantaCruz	sc-9969	Tumor de mama	C32a	1::100	1::200	125	Mouse monoclonal
7	AKAP14	ProteinTech	14622-1-AP	Rim (glomérulo)	Jukart	1::100	1::300	35	Rabbit polyclonal
8	PPIL1	Sigma	SAB1401704	Linfonodos	HeLa	1::200	1::500	18	Mouse monoclonal

3.9.3. Processamento e análise estatística dos dados de imunomarcação obtidos com TMAs

Uma vez digitalizadas as lâminas de TMA coradas por imunohistoquímica, as imagens ficam disponíveis no sistema da Aperio que podem ser acessadas remotamente para análise. Desta forma, é possível fazer o uso das ferramentas disponíveis no pacote do programa do ImageScope (Aperio System, INc). Após a inspeção visual dos *spots* (casos selecionados para nosso estudo), as medidas totais de intensidade por coloração DAB foram extraídas com o programa CountPixel V9 (Aperio System Inc.). Em nosso estudo, consideramos os resultados expressos em valores de “positividade” que refletem a intensidade de pixels na cor específica do DAB. Correspondem ao número total de pixels positivos (somatória dos pixels fracos, moderados e fortes positivos) divididos pelo número total de pixels da amostra, representado através de *valores entre 0 e 1.*

A determinação do valor de corte para os valores contínuos de positividade de imunomarcação utilizados na construção das curvas de sobrevida e probabilidade de

desenvolvimento de metástases foi determinado utilizando o programa X-tile (Camp et al. 2004). O programa determina o valor de corte de positividade que permite separar otimamente as amostras do conjunto de treinamento em dois grupos em função do tempo de sobrevida ou tempo até o desenvolvimento de metástases. O programa cria dois subgrupos (alta ou baixa positividade) utilizando os possíveis valores de corte. Para cada possível valor de corte é calculado o Qui-quadrado (χ^2) que distingue os dois grupos de amostras. O teste X^2 permite investigar se o valor de corte de positividade consegue separar subgrupos de pacientes com tempo de sobrevida (ou de desenvolvimento de metástases) distinto: quanto maior o valor da estatística X^2, maior a probabilidade de rejeição da hipótese nula, ou seja, que a sobrevida média dos pacientes seja igual nos subgrupos definidos pelo valor de corte selecionado. O valor ótimo de corte é aplicado às amostras do conjunto de validação. A significância estatística para o valor de corte aplicado ao conjunto de validação é calculada pelo teste *log-rank*. A utilização da abordagem do X-tile permite o estabelecimento de um valor de corte com fundamentação estatística ao invés de um valor arbitrário, o que é especialmente importante quando existe uma distribuição linear e difusa de valores de positividade de marcação contínuos na população total de amostras, sem uma observação evidente da presença de subpopulações.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Mini-Tab (v.16), GraphPad Prism (v. 5) e *R statistical software package*. Primeiramente, para cada gene foi avaliado se os valores de positividade seguem uma distribuição normal, utilizando os testes de normalidade de D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk foram aplicados. Valores de $p \leq 0,05$ rejeitam a hipótese nula dos dados não possuírem uma distribuição normal.

Quando determinado que os valores de positividade do conjunto total de amostras assumia uma distribuição normal, foi aplicado o teste t de *Student* (teste t de *Student*, bicaudal não pareado). Para dados cujos valores de positividade não apresentam uma distribuição normal, as análises estatísticas foram feitas utilizando o U-test não paramétrico de Wilcoxon e Mann-Whitney. Para todos os testes, o limiar de $p \leq 0,05$ foi utilizado para considerar uma diferença significativa.

Para determinar a existência de associação entre a imunomarcação da proteína-alvo e as variáveis anatomopatológicas, foi empregado o teste Qui-quadrado (X^2). Nas análises de sobrevida global e sobrevida câncer-específica foi empregado o estimador de Kaplan-Meier (KM), utilizando um período de seguimento de 60 meses, decorrido entre a data do tratamento cirúrgico e a data do óbito ou do último seguimento.

O tempo de seguimento dos pacientes foi calculado em meses, correspondendo ao intervalo entre o tempo decorrido data da cirurgia e a data do último seguimento clínico do paciente de 60 meses. A existência de diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de KM foi avaliada pelo teste *log-rank* (análise univariada). O modelo de riscos proporcionais de Cox foi empregado para as análises multivariadas, seguindo a estratégia *Stepwise backward*. Apenas as variáveis que apresentaram uma significância de $p < 0,10$ na análise univariada (teste *log rank*) foram selecionadas para uma análise multivariada. Permaneceram no modelo múltiplo as variáveis com $p < 0,05$. A medida de risco estimada foi a razão das funções de risco (*hazard ratio* – HR), que é a exponencial dos coeficientes de regressão do modelo múltiplo.

3.9.2 MMP Array

O meio condicionado das culturas de MDA-MB-231 shCIP4 e seu controle TRIPZ foi coletado e analisado usando-se o ensaio Human MMP & TIMP Array Discovery (Eve Technologies Corporation, Calgary AB, Canada).(http://www.evetechnologies.com/discoveryAssayListHuman.php).

4. RESULTADOS

4.1. Prevalência dos subtipos moleculares de câncer de mama

Os casos de carcinoma mamário representados no TMA foram categorizados de acordo com a expressão dos receptores hormonais ER e PR, além da expressão de HER2. A figura 7A mostra a prevalência de cada subtipo na população estudada. Do total de pacientes incluídos nesta análise (292), apenas 245 pacientes possuíam todas as informações disponíveis para esta classificação. Desses, a maioria enquadra-se no subtipo Luminal A totalizando 69% dos casos (169 casos). O subtipo Luminal B apresentou apenas 13 casos, representando 5% dos casos. Os casos categorizados como subtipo HER2+ são 22 no total e constituem 9% dos casos. Finalmente, os pacientes de pior prognóstico, *Basal Like*, com 41 casos, totalizando 17 dos casos analisados. Essa distribuição é condizente aos achados na literatura (Rakha et al. 2008; Rakha and Ellis 2009; Rakha et al. 2009; Rakha et al. 2010), conforme será posteriormente discutido.

Curvas de Kaplan-Meyer foram calculadas para avaliar a probabilidade de desenvolvimento de metástase nos pacientes que compõe o estudo, agrupados de acordo com os 4 subtipos moleculares. Embora sem significância estatística, observou-se uma tendência ao menor de desenvolvimento de metástase entre os pacientes com subtipo Luminal A (Figura 7B). Ao considerar apenas os subtipos classicamente descritos na literatura como de melhor e pior prognóstico, Luminal A e *Basal Like*, respectivamente (Rakha et al. 2010), nota-se que as pacientes com tumores subtipo Luminal A apresentam menor chance de desenvolvimento de metástase (Figura 7C). Apesar de também não ser significativo (p=0,06) as curvas

mostram uma tendência de separação consistente ao observado na literatura *(Rakha et al. 2010)* (Figura 7C).

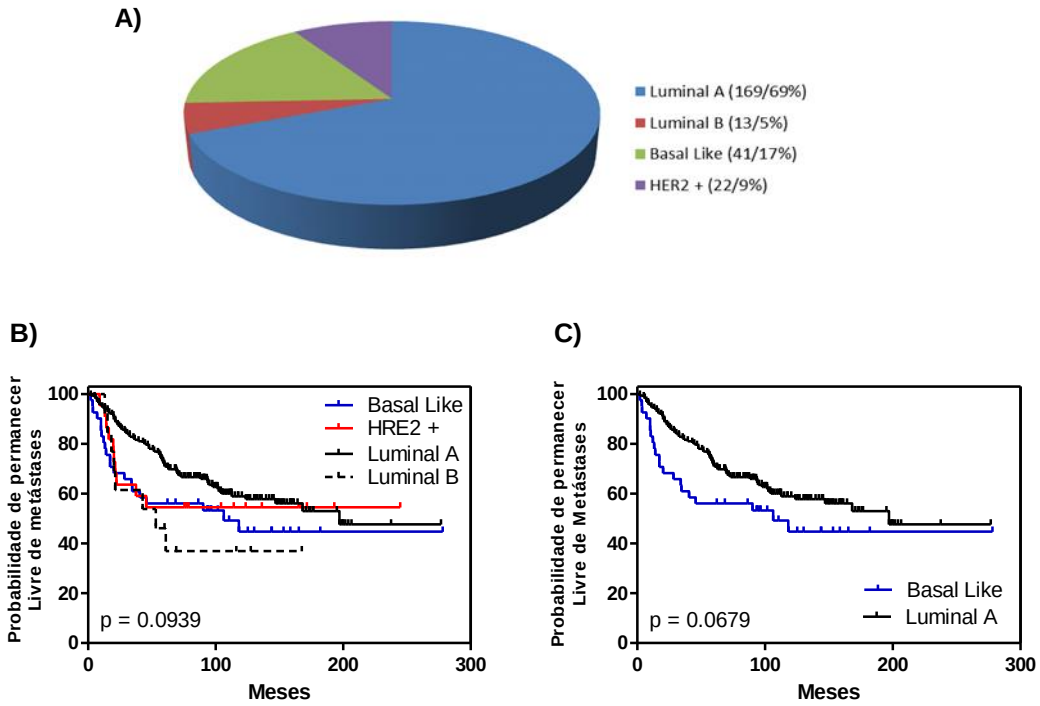


Figura 7. Classificação dos pacientes de acordo com o status da expressão de receptores hormonais e HER2. A) Gráfico mostrando a estratificação dos casos de câncer de mama invasivos em 4 subtipos: *Basal like (Triple negative), HER2+,* Luminal A e Luminal B. De forma concordante à literatura, a maior parte dos pacientes (69%) está entre os classificados como Luminal A. Os subtipos Luminal B, *Basal Like* e HER2+, perfazem 5%, 17% e 9%, respectivamente. **B)** Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a probabilidade de desenvolvimento de metástase em pacientes agrupados por subtipo molecular. Apesar de não mostrar significância estatística, o gráfico mostra um tendência de menor chance de recaída em metástases para o subtipo Luminal A. **C)** Quando comparados isoladamente os subtipos Luminal A, de melhor prognóstico, e o subtipo *Basal Like*, de pior prognóstico, houve uma separação marginalmente significante na chance em desenvolver recaída por metástases. Nota-se um pior prognóstico (maior probabilidade de desenvolvimento de metástase) em pacientes classificados como *Basal like* quando comparados aos do subtipo Luminal A.

4.2. Detecção imunohistoquímica das proteínas candidatas em tumores de mama utilizando TMAs

As reações de imunohistoquímica foram realizadas no laboratório de patologia investigativa no Departamento de Anatomia Patológica do hospital AC Camargo. Foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (Dabco), conforme descrito na seção MATERIAL E MÉTODOS. As lâminas assim imunomarcadas foram digitalizadas no equipamento *ImageScope (Aperio inc.).* Em seguida, foi feita a seleção dos casos de acordo com a disponibilidade de *spot* e representatividade de áreas de lesão invasiva. Depois de manualmente delimitadas as áreas de carcinoma invasivo em cada caso, a intensidade de coloração DAB foi calculada com o Algoritmo "*Positive Count Pixel V9"* disponível no programa *ImageScope* da *Aperio system*. A medida de positividade gerada por este algoritmo remete a intensidade de coloração nas regiões previamente delimitadas, o que também foi conferido visualmente no microscópio com o auxílio da médica patologista Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório. Um painel correlacionando a positividade numérica dada pelo *software* e a intensidade de coloração DAB aferida visualmente nos respectivos casos foi montado para comparação (Figura 8A). Esta padronização foi feita com o intuito de verificar se a intensidade de coloração DAB era diretamente proporcional à positividade fornecida pelo *software.* Os casos foram dispostos em ordem crescente de positividade. É possível verificar uma clara relação entre a positividade e a intensidade de coloração resultante da reação imunohistoquímica, validando dessa forma o Algoritmo "*Positive Pixel Count V9*" utilizado.

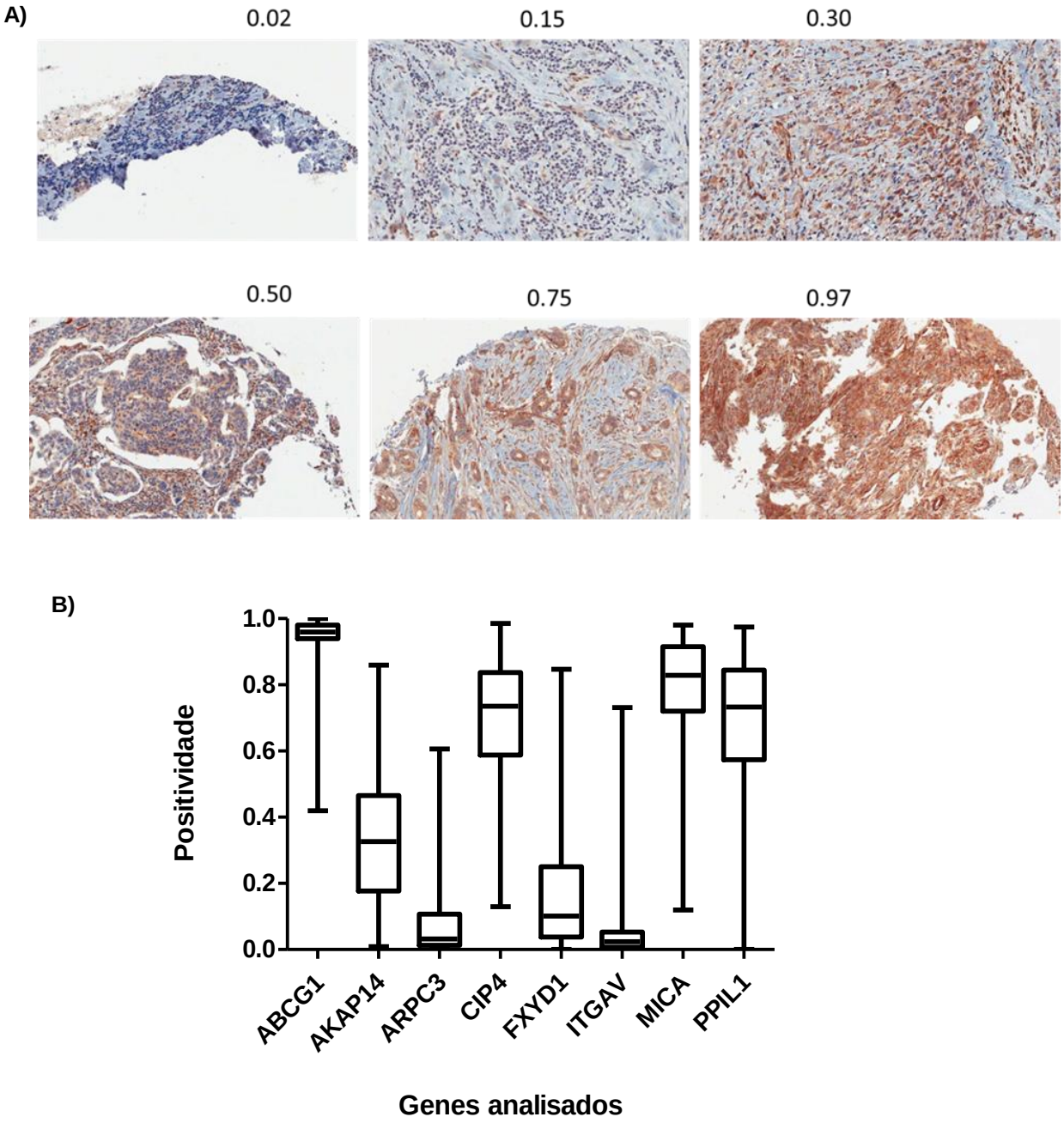


Figura 8. Detecção imunohistoquímica de marcadores candidatos em amostras de carcinoma de mama invasivo. A) O painel de figuras contém imagens representativas de casos com diferentes intensidades de coloração para CIP4 e suas respectivas positividades calculadas pelo Algoritmo "*Positive Pixel Count V9*" da *Aperio Biosystem*. A reação imunohistoquímica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, (ver item na seção MATERIAL E MÉTODOS), com a formação do cromógeno DAB (cor amarronzada) em quantidade proporcional a abundância da proteína-alvo. A positividade numérica calculada automaticamente pelo programa *Pixel Count* está mostrada acima de cada micrografia. **B)** O gráfico de *Boxplot* mostra a distribuição dos valores de positividade dos genes analisados por *Tissue Microarray*. Nota-se que os genes *ARPC3* e *ITGAV* tiveram positividade muito baixa. Por outro lado, *ABCG1* apresentou a maioria das amostras com posividades próximas ao valor máximo 1.

Uma vez padronizada a reação de imunohistoquímica, bem como a ferramenta para extração da positividade, foram feitas as reações para os 8 genes selecionados no estudo. Como etapa prévia a imunohistoquímica, extratos proteicos provenientes de linhagens celulares de câncer de mama foram submetidos a *western blot* e imunofluorescência para verificação da especificidade do anticorpo. Além disso, foi feita quantificação dessas proteínas nas linhagens, que possuíam diferentes graus de malignidade e análise preliminar da localização subcelular (resultados expostos na seção ANEXOS organizados separadamente de acordo com o gene analisado).

Os resultados de positividade gerados após a reação de imunohistoquímica para cada gene foram reunidos no gráfico mostrado na figura 8B. Como é possível observar, os valores de positividade são bastante variáveis de acordo com o gene. Para os genes *ARPC3* e *ITGAV*, as positividade mostraram valores baixos com médias de 0,08 e 0,06 respectivamente. Por se tratar de uma proteína localizada preferencialmente na membrana citoplasmática, ITGAV apresenta fraca imunomarcação na maioria dos casos. Contrariamente, ABCG1 mostrou uma forte imunomarcação, com média de 0,93, mas com vários casos com a positividade próxima a máxima 1. Apesar de previamente padronizado em amostras de tecidos, que conhecidamente expressam ABCG1 (carcinoma cervical), aparentemente a imunomarcação desta proteína foi exacerbada nas amostras mamárias presentes nos TMAs. Os demais genes, AKAP14, CIP4, FXYD1, MICA e PPIL1, apresentaram valores de positividades mais distribuídas, não sendo nem muito baixas e nem muito altas. A média para cada um deles foi: AKAP14 - 0,33; CIP4 - 0,69; FXYD1 - 0,17; MICA – 0,79 e PPIL1 – 0,68.

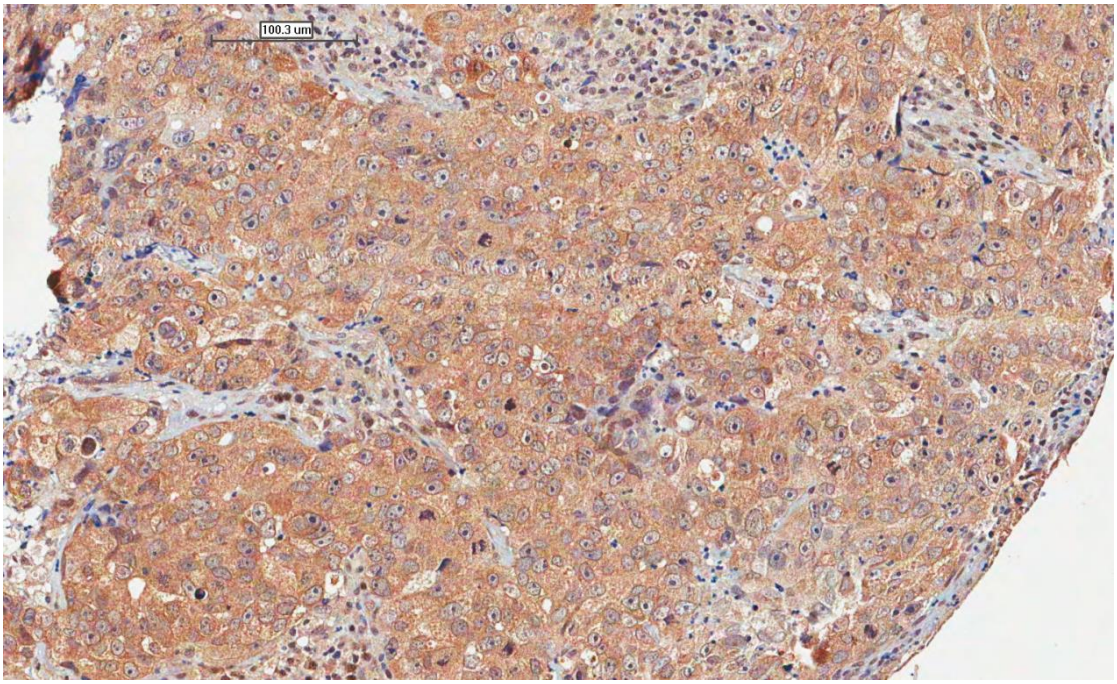
Para cada proteína, foram determinados valores de corte de positividade ótimos para a separação dos pacientes em subgrupos em função da sobrevida ou da probabilidade de desenvolvimento de metástase utilizando o software *X-tile (*descrito em detalhe na seção MATERIAL E MÉTODOS*)*.

Inicialmente foram feitas análises com 100 pacientes, selecionados sequencialmente pelo numero do caso. Para cada proteína investigada, os valores de positividade foram extraídos e tabelas foram montadas associando esse dado às informações clínicas dos pacientes. De posse de informações como tempo de sobrevida livre da doença e tempo até a incidência de recaída em metástases, curvas de sobrevida e de probabilidade de risco no desenvolvimento de metástases foram montadas para cada gene. As proteínas codificadas pelos genes *ABCG1, AKAP14, FXYD1* e *MICA* não apresentaram nenhuma relação entre os níveis da expressão e a sobrevida câncer específica e/ou risco de desenvolvimento de metástases (resultados mostrados no item ANEXOS de acordo com o gene), sendo assim, descontinuados desse estudo. Apenas 4 dos genes analisados mostraram resultados de TMA promissores. São eles: *PPL1, ITGAV, ARPC3* e *CIP4*. Posteriormente, a análise das proteínas codificadas pelos genes PPIL1 e CIP4 foi estendida para o conjunto completo dos 292 pacientes. Dentre os critérios utilizados para a priorização destes 2 candidatos e sua análise em um conjunto maior de amostras, estão: i) a observação de valores de positividade não muito elevados e nem muito baixos, ii) associação significativa entre os valores de imunomarcação e parâmetros clínicos na análise preliminar com 100 pacientes, e iii) evidências na literatura que o indicassem como marcador prognóstico no câncer de mama. Os resultados da análise de TMA dos candidatos PPIL1, ITGAV, ARPC3 e CIP4 são mostrados abaixo.

4.3. PPIL1

A proteína codificada por este gene atua como uma isomerase *cis/trans* de ligações peptídicas contendo prolina. A PPIL1 possui papel crucial no dobramento de proteínas envolvidas no reconhecimento imune de linfócitos T e no *splicing* de pre-RNAm (Hegele et al. 2012). Para verificação da presença e localização, bem como a quantificação de PPIL1 nos tecidos, foram feitas reações de imunohistoquímica nas lâminas de TMA contendo amostras de câncer de mama da coorte de pacientes previamente descrita. Antes da reação de imunohistoquímica, foram realizados *western blots* e imunofluorescência para padronização do anticorpo anti-PPIL1 (ANEXOS: Figura S1 e S2), utilizando as linhagens de câncer de mama em cultura. Imagens representativas da imunohistoquímica para PPIL1 nos TMAs são mostradas na figura 9. O conjunto de imagens evidencia as diferentes localizações de PPIL1, que pode ser predominantemente citoplasmática com pouca marcação nuclear (Figura 9A), ou que pode ser excessivamente nuclear, além de citoplasmática (Figura 9B). É interessante notar que, quando as linhagens celulares de câncer de mama foram submetidas à imunofluorescência o mesmo padrão nuclear de PPIL1 foi observado, mas somente na linhagem metastática MDA-MB-231 (ANEXOS: Figura S2).

A)



B)

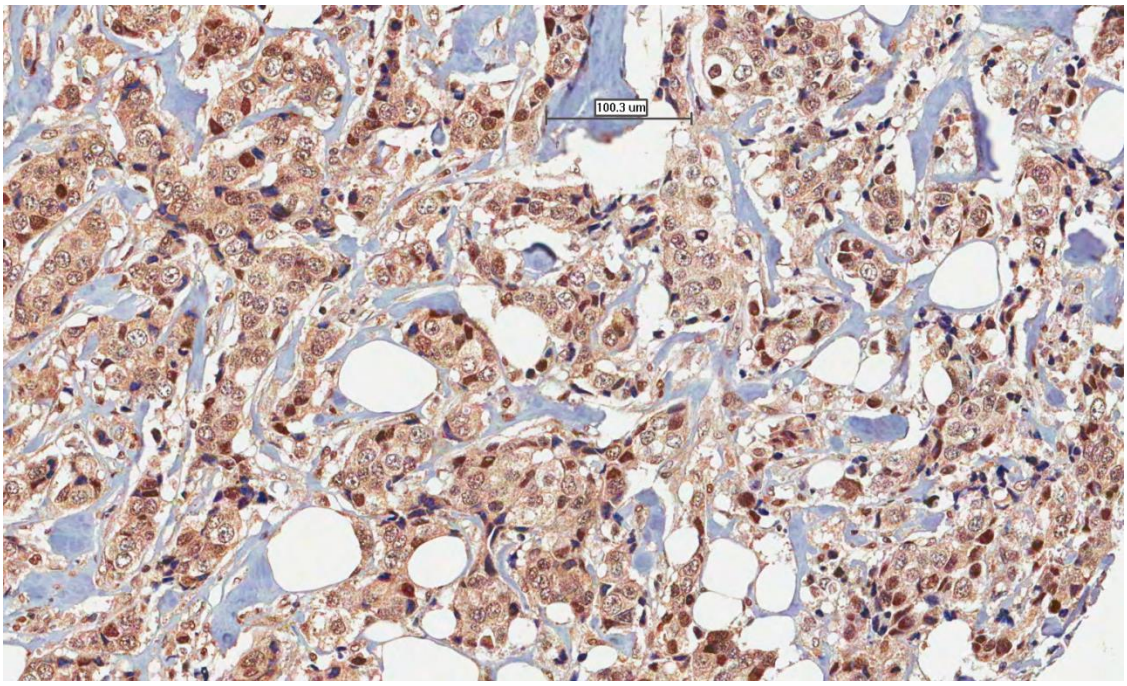


Figura 9. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para PPIL1. A) Fotomicrografia demonstrando a detecção imunohistoquímica para PPIL1. Neste caso observa-se, que a localização subcelular desta proteína foi predominantemente citoplasmática, com poucas evidências de localização nuclear. A positividade encontrada neste caso foi de 0,87. **B)** Neste caso, com positividade semelhante ao anterior, 0,84, observa-se de maneira evidente a localização nuclear de PPIL1 num grande número de células. Este caso possui maior acometimento linfonodal que o anterior, apesar de ambos serem carcinomas ductais invasivos sem apresentarem desenvolvimento de metástases. As barras horizontais pretas na parte superior das imagens correspondem a 100 µm.

No estudo anterior usando microarranjos de DNA, *PPIL1* mostrou expressão de transcritos diferencialmente aumentada em pacientes acometidos por metástases nos 5 anos subsequentes à mastectomia (Figura 5). Nossos resultados de TMA, considerando todos os subtipos tumorais simultaneamente, mostraram diferenças significativas entre o nível de expressão de PPIL1 e a sobrevida global. A expressão aumentada de PPIL1 está relacionada a menores taxas de mortalidade (Figura. 10A). Da forma similar, a sobrevida câncer específica também apresentou a mesma tendência, onde a alta expressão de PPIL1 predispõe a menores taxas de mortalidade relacionada à doença no conjunto total de pacientes (Figura. 10B). Em seguida, dividimos os casos de acordo com seu subtipo molecular, bem como seus respectivos gráficos de Kaplan-Meyer (Figuras 10C, 10D e 10E). Em todos os casos, a tendência de maior expressão de PPIL1 e taxas mais altas de sobrevida câncer específica se mantém. Os casos do subtipo Luminal A exibiram esta tendência, embora à margem da significância estatística (p=0.0616) (Figura 10C). Enquanto todas pacientes, exceto Luminal A e as do subtipo *Basal Like* mostraram significância entre a expressão de PPIL1 e a sobrevida câncer específica, com *p-values* de 0,038 e 0,045, respectivamente (Figuras 10D e 10E).

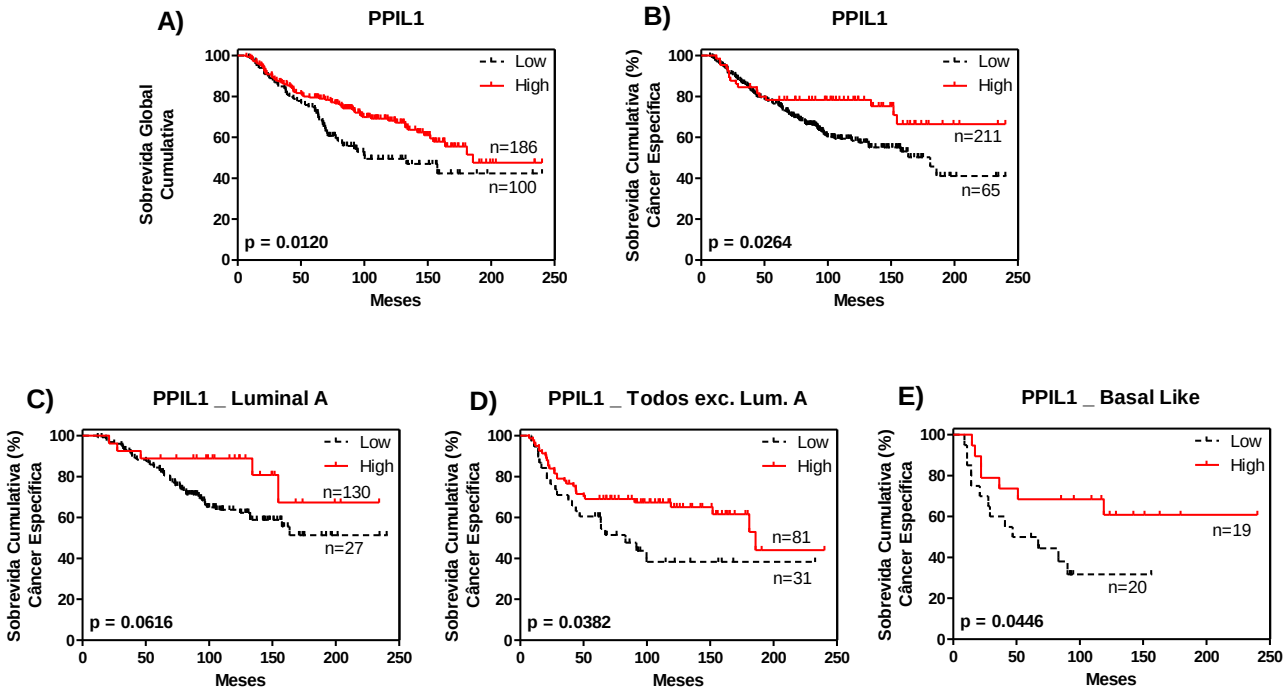


Figura 10: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de PPIL1. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama (Valor de corte de positividade: 0,64). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica (Valor de corte de positividade: 0,85). **C)** Sobrevida global considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,85). **D)** Sobrevida global considerando todos os pacientes, exceto aqueles do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,63). **E)** Sobrevida global considerando apenas os pacientes do subtipo *Basal Like* (Valor de corte de positividade: 0,73). Em A e B foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos C, D e E.

A expressão de PPIL1 foi posteriormente avaliada quanto à capacidade de predizer o aparecimento de metástases. Ao analisar todos os subtipos conjuntamente, verificamos que há uma tendência, sem significância estatística (p=0,075), de que os casos com maior expressão de PPIL1 tenham menor probabilidade em desenvolver metástases (Figura 11A). Quando o subtipo Luminal A é analisado separadamente, observa-se que a maior expressão de PPIL1 se reflete em uma menor probabilidade em desenvolver metástases (p=0,029) (Figura 11B). Os demais subtipos com exceção do Luminal A, não mostraram significância estatística na associação entre a expressão de PPIL1 e a probabilidade de desenvolvimento de metástase (Figura 11C). Finalmente, os casos do tipo *Basal Like* mostraram a mesma relação entre a expressão de PPIL1 e a probabilidade de desenvolver metástases que o subtipo Luminal A, embora com menor significância estatística (p=0,054) (Figura 11e).

Os dados obtidos nos experimentos com TMA para a expressão protéica de PPIL1 e sua associação com a sobrevida ou chance de desenvolvimento de metástase dos pacientes não confirmam os resultados obtidos anteriormente através da quantificação de seus transcritos por microarranjo de DNA. Nos experimentos com microarranjo de DNA o gene *PPIL1* apresentou níveis relativamente maiores de transcritos nos tumores de pacientes com recaída nos 5 anos seguintes ao tratamento, enquanto nossos resultados de TMA indicam que a proteína está diminuída nos tumores de pacientes com maior incidência de metástases. Discrepâncias entre achados de microarranjo de DNA e *TMA* não são raras e serão discutidas com mais detalhes na seção "Discussão".

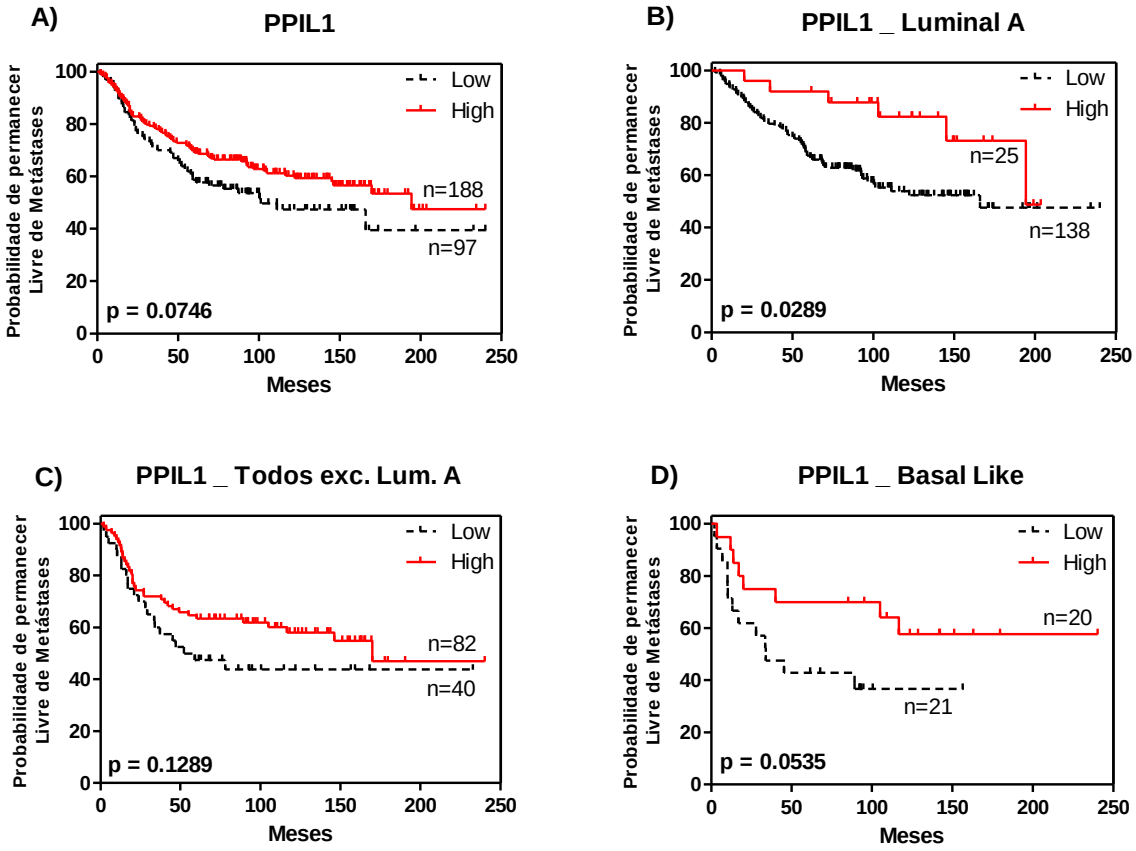


Figura 11: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de PPIL1. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase em toda a população estudada (Valor de corte de positividade: 0,63). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,85). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,91). **D)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo *Basal Like* (Valor de corte de positividade: 0,73). Em A foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos C eD.

4.4. ITGAV

Integrinas são proteínas cruciais na sinalização bioquímica envolvida na adesão celular. Durante a invasão do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio transformado, as células invasivas reconhecem elementos da matriz extracelular através das integrinas (Sims et al. 2000; Denadai et al. 2013). Para verificação da presença e localização, bem como a quantificação de ITGAV nos tecidos, foram feitas reações de imunohistoquímica nas lâminas de TMA contendo amostras de câncer de mama da coorte de pacientes previamente descritas. De forma prévia, foram feitos *western blots* e imunofluorescência para padronização do anticorpo primário utilizado (ANEXOS: Figuras suplementares S3 e S4). Após a padronização foram realizados experimentos de marcação imunohistoquímica de ITGAV em amostras de tumores de mama no TMA.

Em geral detectou-se uma fraca imunomarcação de ITGAV nas amostras presentes nos TMAs, o que pode ser reflexo de sua localização de membrana, ou mesmo pouca abundância nos tecidos analisados (Figura 8B). As imagens mostradas na figura 12 ilustram 3 diferentes casos do mesmo bloco de TMA com situações distintas tanto para localização, quanto para a intensidade de ITGAV. A primeira das Fotomicrografias mostra ácinos normais com a característica delimitação feita por células mioepiteliais, conforme indicado pelas setas pretas. Neste caso a expressão de ITGAV é baixa e não é detectada na interface das células luminais. Uma discreta imunomarcação desta proteína pode ser vista no contorno do ácino, o que coincide com a localização das células mioepiteliais (Figura 12A). No caso mostrado na figura 12B, a intensidade de imunomarcação de ITGAV é maior do que no caso anterior, sendo encontrado nas membranas de forma individualizada de cada célula neoplásica. Além disso, não são encontradas células

mioepiteliais circundando os grupamentos celulares. É possível notar desorganização na estrutura acinar, acompanhada de pleomosfismo nuclear com alguns deles hipercromáticos (Figura 12B). Na última imagem da série, a Fotomicrografia evidencia células com forte imunomarcação de ITGAV pode ser vista na membrana das células tumorais, mas também em seu citoplasma. Novamente células mioepiteliais não foram visualizadas no contorno dos grupamentos celulares. (Figura 12C).

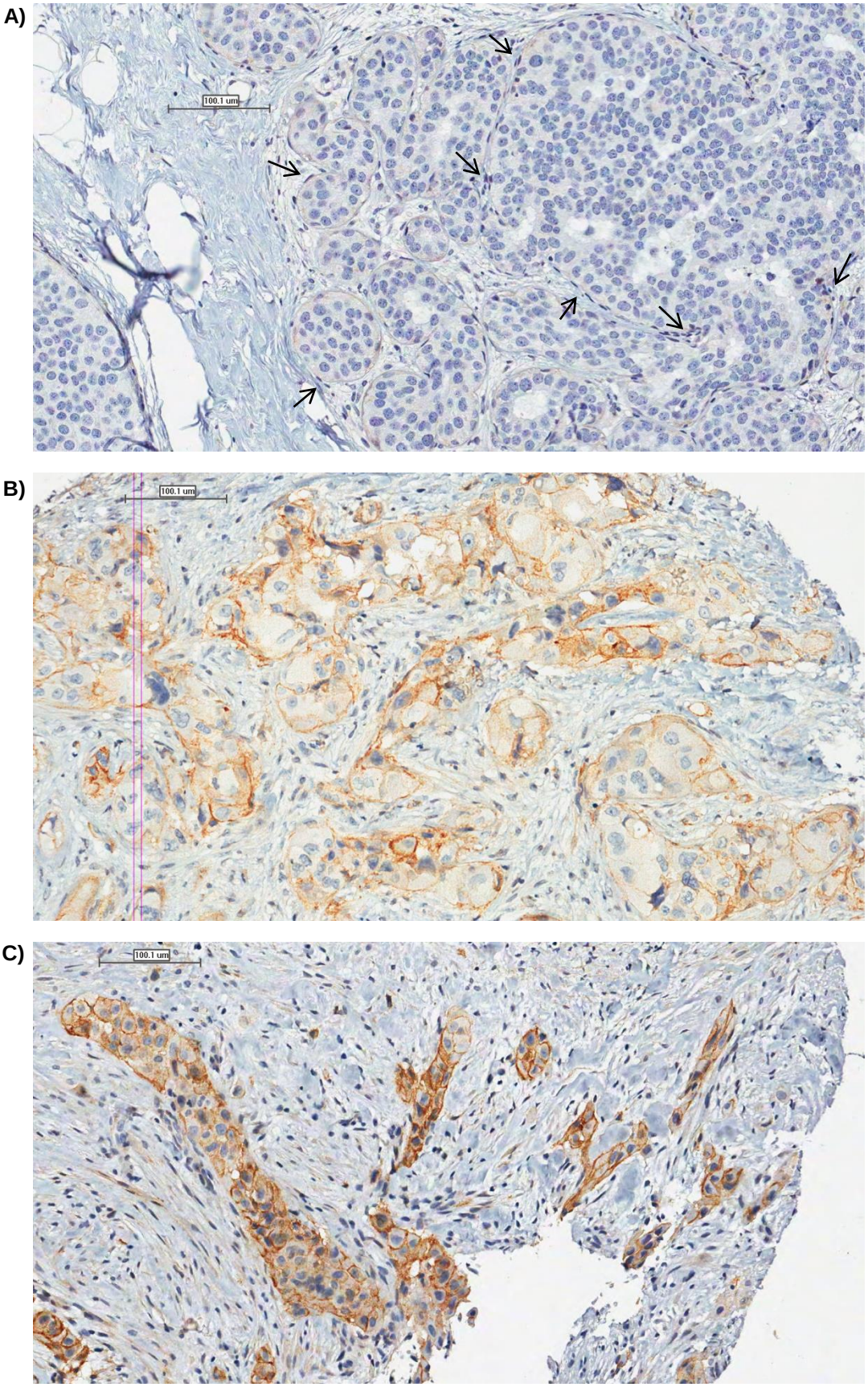


Figura 12 Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para ITGAV. A) Detecção imunohistoquímica de ITGAV em células epiteliais do parênquima mamário. A imagem mostra elementos

epiteliais mamários com hiperplasia ductal usual (HDU). Os ácinos, normais, estão circundados por células mioepiteliais, como indicam as setas pretas. Observa-se baixa marcação imunohistoquímica, com positividade de 0,003. Há uma tênue marcação de ITGAV circundando a totalidade dos ácinos, mas não entre as células individuais. **B)** Neste caso, a Fotomicrografia mostra grupamentos celulares malignos invadindo o estroma. Há poucas evidências de células mioepiteliais margeando esses grupamentos celulares, onde a reação imunohistoquímica evidenciou, de forma marcante, a localização de ITGAV na membrana celular. O que foi observado para muitas células individuais. A positividade deste *spot*, que considera o total de pixels tanto da membrana quanto do citoplasma, foi de 0,65. **C)** Fotomicrografia demonstrando a localização citoplasmática de ITGAV detectada por imunohistoquímica. A positividade encontrada neste caso foi de 0,73. Da mesma forma que o caso anterior, ITGAV foi visualizada predominantemente na membrana celular, além da presença citoplasmática. É possível notar um padrão de membrana típico semelhante ao observado nas linhagens celulares por imunofluorescência (Figura Suplementar S4). As barras horizontais no canto superior esquerdo correspondem a 100µm.

O gene *ITGAV* mostrou expressão de transcritos diferencialmente aumentada em pacientes acometidos por metástases nos 5 anos subsequentes à mastectomia (Figura 5). Nossos resultados de TMA, ao analisar a todos os subtipos tumorais simultaneamente, não demonstraram diferenças significativas entre o nível de expressão de ITGAV e a sobrevida global (Figura. 13A). Da mesma forma, a sobrevida câncer específica não apresentou relevância com a expressão de ITGAV no conjunto total de pacientes (Figura. 13B). Entretanto, ao analisar apenas os pacientes do subtipo Luminal A, notamos que a expressão aumentada de ITGAV está relacionada a menores taxas de mortalidade relacionadas pela doença (Figura 13C). Por outro lado os pacientes dos outros subtipos tumorais, que não Luminal A, mostraram a tendência inversa onde a maior expressão indica menores chances de sobrevida câncer específica (Figura 13D).

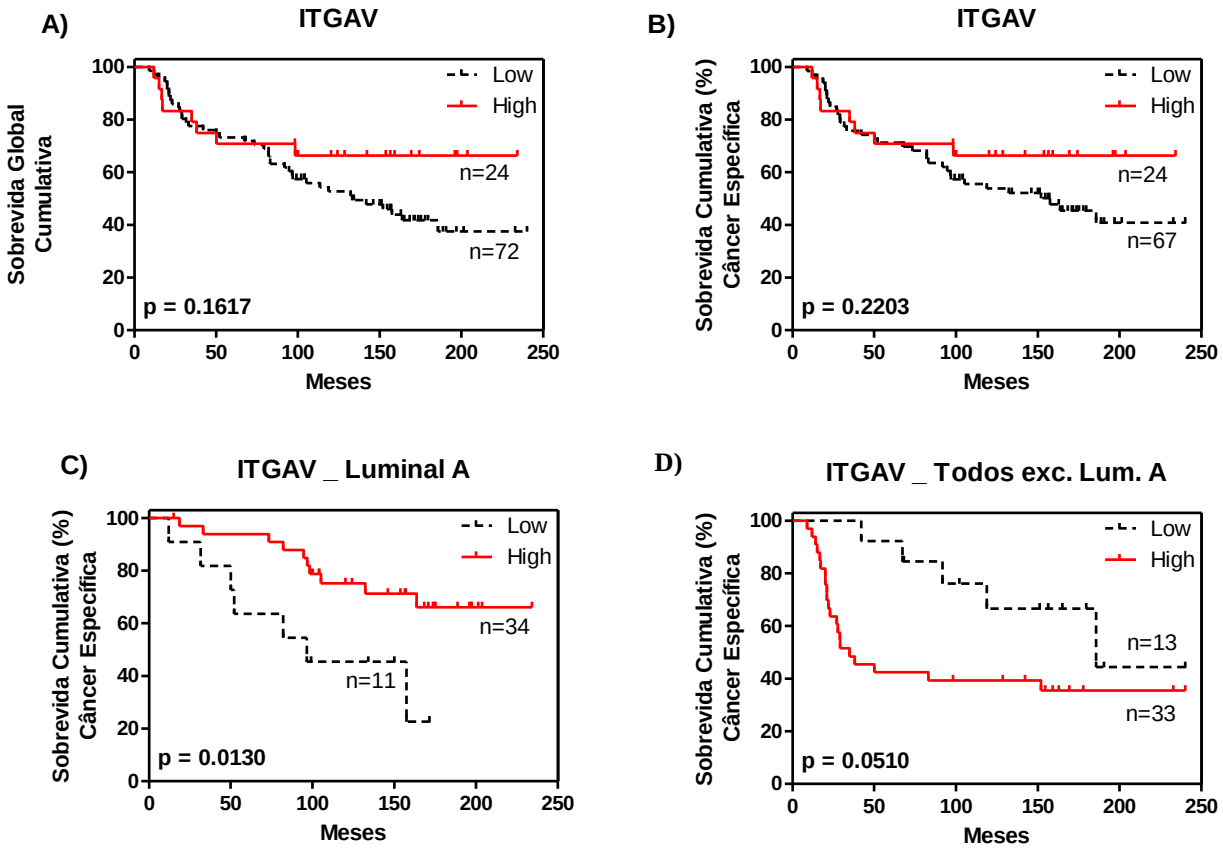


Figura 13: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de ITGAV. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes de acordo com a expressão de ITGAV (Valor de corte de positividade: 0,05). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica. (Valor de corte de positividade: 0,05). **C)** Sobrevida câncer específica considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,006). **D)** Sobrevida câncer específica considerando todos os pacientes, exceto aqueles do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,01). Em A e B foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos C, D..

A expressão de ITGAV foi posteriormente avaliada quanto à capacidade de predizer a incidência de recaída em metástases. Ao analisar conjuntamente os subtipos, não há diferenças significantes entre a expressão de ITGAV e a probabilidade de recaída em metástases (Figura 14A). Quando o subtipo Luminal A é analisado separadamente, observa-se que a maior expressão de ITGAV reflete numa menor probabilidade de recaída em metástases (Figura 14B). Os demais subtipos com exceção do Luminal A, mostraram novamente o oposto: Quanto maior a expressão de ITGAV, maior probabilidade de desenvolvimento de metástases (Figura 14C).

ITGAV não foi o único a apresentar discrepâncias entre sua expressão e comportamentos biológicos distintos nos diferentes subtipos de carcinomas mamários analisados (principalmente Luminal A), como será exposto a seguir. Mesmo com resultado promissores, este gene não foi o escolhido para as análises funcionais que se seguiram.

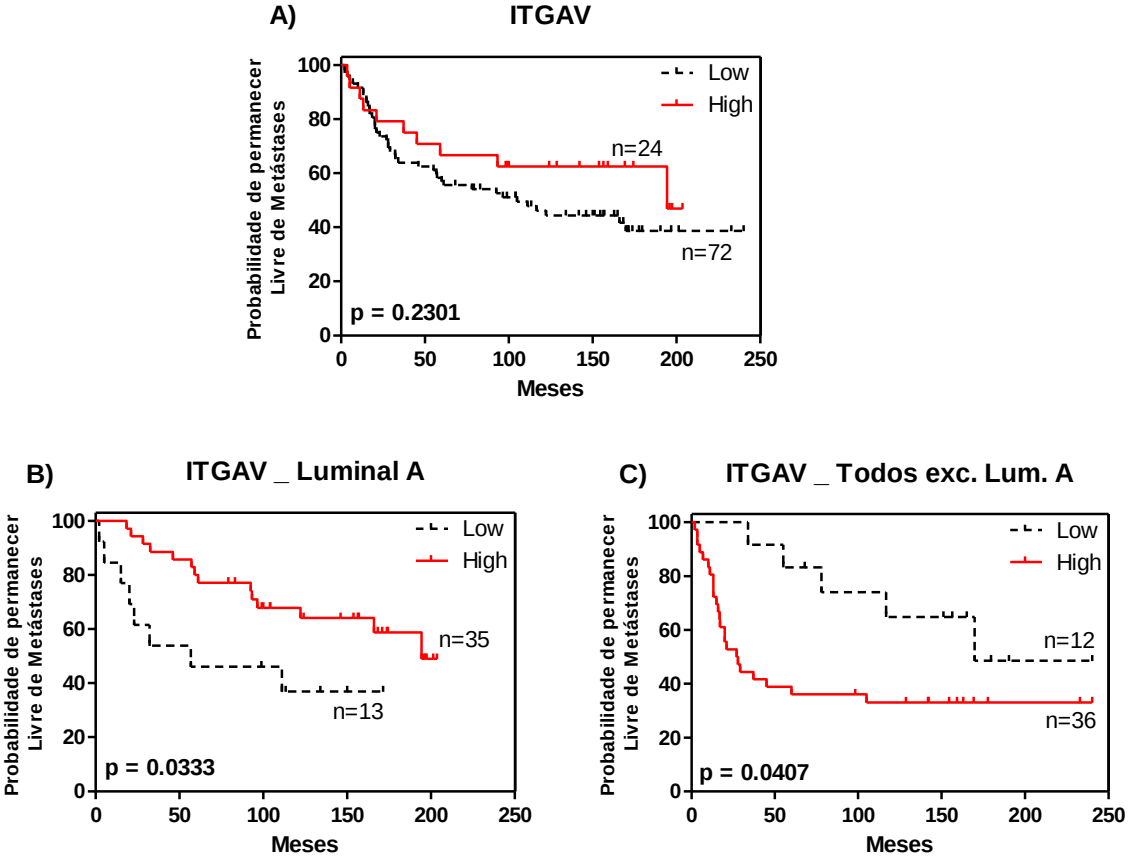


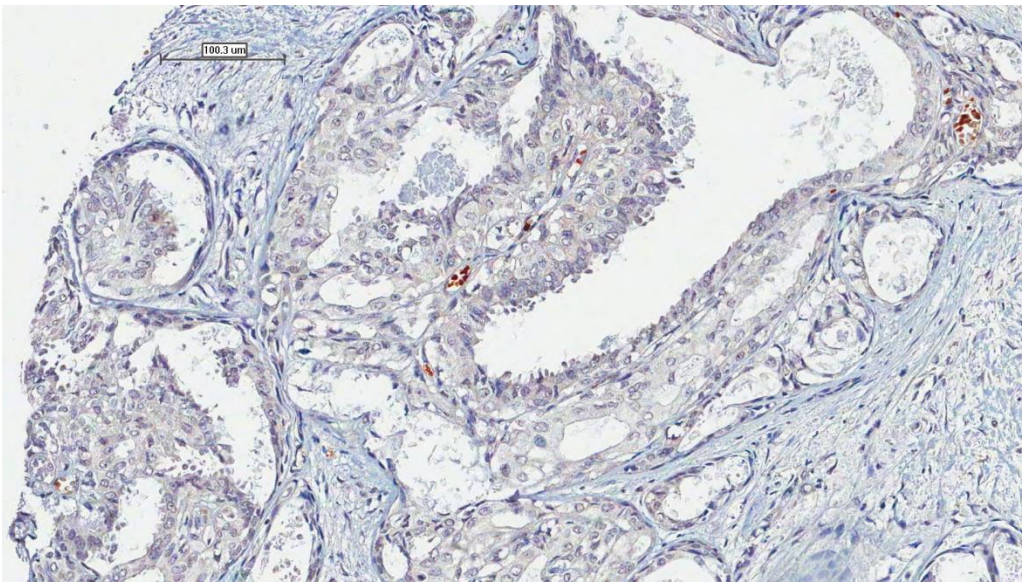
Figura 14: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de ITGAV. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase no conjunto total dos pacientes estudados (Valor de corte de positividade: 0,05). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,05). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,05). Em A foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos B e C

4.5. ARPC3

A proteína codificada pelo gene *ARPC3* (*Actin Related Protein 2/3 Complex*) faz parte do complexo efetor de elongação dos filamentos de actina em seus pontos de ramificação, que se encontra ativo durante os processos celulares de migração e invasão celular . Para verificação da presença e localização de ARPC3, bem como a quantificação nos tecidos, foram feitas reações de imunohistoquímica nas lâminas de TMA contendo amostras de câncer de mama da coorte de pacientes previamente descrita.

As reações de imunohistoquímica feitas para ARPC3 mostraram-se pouco reativas na maioria dos casos, conforme já mostrado no gráfico da figura 8B. As imagens mostradas na figura 15 mostram 2 casos constituintes do mesmo bloco de TMA com diferentes intensidades de imunomarcação. Em ambos os casos, a localização da proteína é citoplasmática. No primeiro caso, a intensidade é, como na maioria dos casos, muito baixa com positividade de 0,003 (Figura 15A). Enquanto que no caso seguinte, a imunomarcação foi mais intensa apresentando positividade 0,33 (Figura 15B).

A)



B)

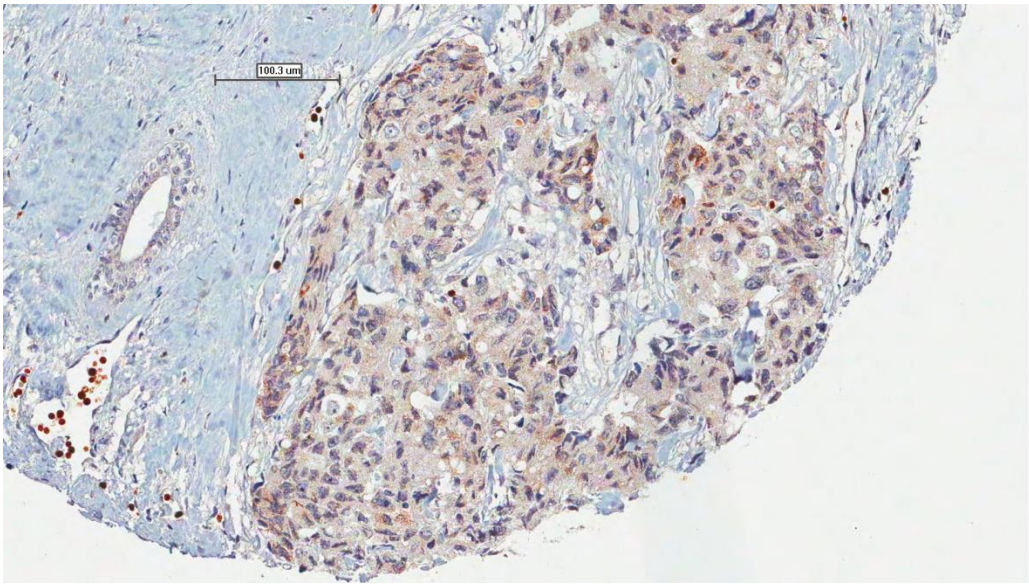


Figura 15. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamários corados imunohistoquímica para ARPC3. **A)** Caso com positividade 0.003, que é próxima ao valor mínimo. A maioria dos casos mostra um padrão de baixa imunomarcação para ARPC3. **B)** Caso com positividade 0.33. Este *spot* corresponde ao caso 365 e é integrante do mesmo bloco de TMA do caso anterior, 363. Isso implica que ambos os *spots* foram submetidos às mesmas condições. As linhas pretas no canto superior esquerdo correspondem a 100µm.

Como será discutido posteriormente, o gene ARPC3 mostrou que seus transcritos estão diferencialmente aumentados em pacientes que apresentaram metástases após 5 anos de mastectomia (Figura 5). Nossos resultados de TMA apontam que quanto maior a expressão desta proteína, maior a chance de sobrevida (Figura 16). Isso foi observado tanto na sobrevida global (Figura 16A), quanto na sobrevida câncer específica (Figura 16B). Da mesma forma, quando analisado o subtipo Luminal A separadamente, também foi observada a mesma tendência de maior expressão de ARPC3 indicando melhores chances de sobrevida (Figura 16C). Por outro lado, quando analisados todos os outros subtipos com exceção de Luminal A, observa-se a inversão de tal tendência (Figura 16D).

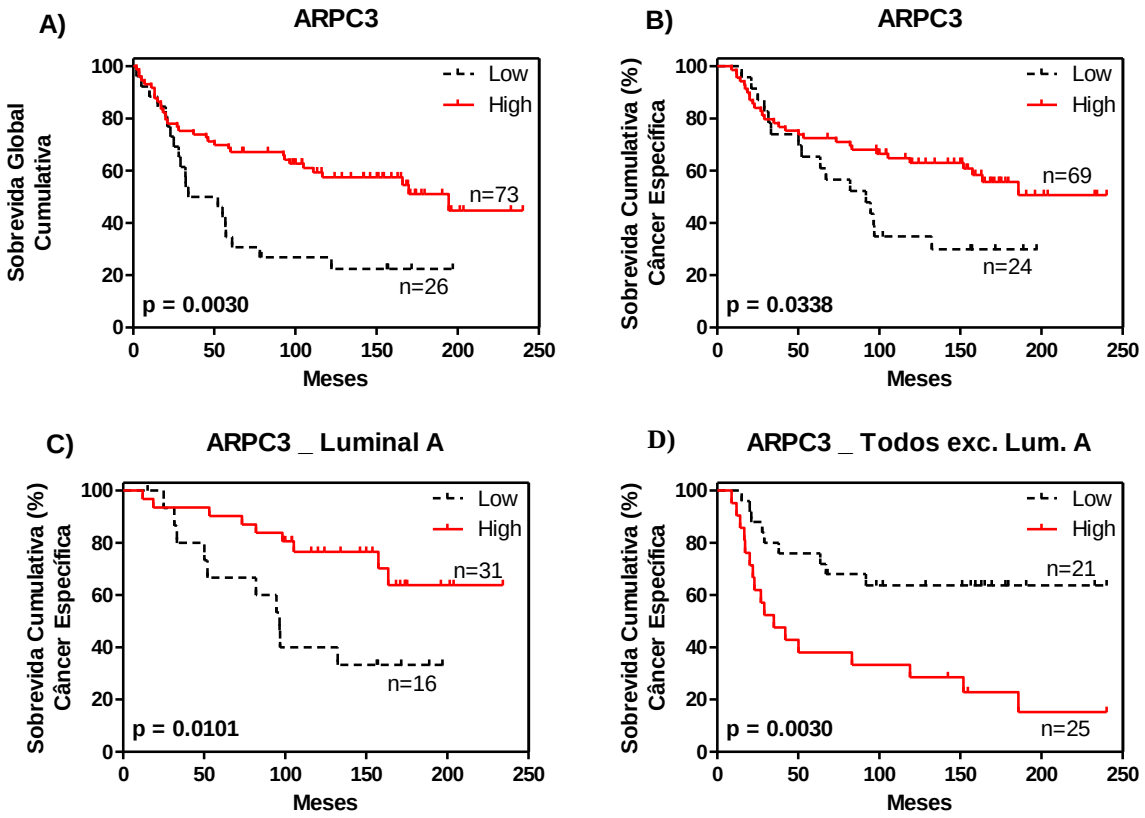


Figura 16: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de ARPC3. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama (Valor de corte de positividade: 0.013). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica (Valor de corte de positividade: 0,013). **C)** Sobrevida câncer específica considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,013). O gráfico de Kaplan-Meyer indica que nesses pacientes, os que possuem menor expressão de ARPC3 mostraram maiores taxas de óbito pela doença. **D)** Sobrevida câncer específica em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,013). Em A e B foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos C, D

De maneira similar aos resultados de sobrevida, foram realizadas análises para estimar a probabilidade de desenvolvimento de metástases e a positividade de ARPC3 (Figura 17). Esses resultados mostram que a expressão aumentada de ARPC3 favorece a menor probabilidade de desenvolver em metástases (Figura 17A). Da mesma forma, tanto no subtipo Luminal A (Figura 17B), quanto nos outros subtipos (Figura 17C), a maior probabilidade de desenvolver em metástases foi encontrada em pacientes com menor expressão de ARPC3. Desta vez não foi observada inversão de tendência os casos Luminal A quando contrastada com as demais.

Nossos resultados de TMA demonstram que a menor expressão de ARPC3 favorece a maior probabilidade de desenvolvimento de metástases. O que contrasta com o microarranjo de DNA da figura 5, onde se verificou que a presença de transcritos para este gene está diferencialmente aumentada nos casos acometidos por metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. No entanto, sua positividade extremamente baixa e ausência de evidências na literatura que o indicassem como marcadores de prognóstico nos motivaram a não selecioná-lo para uma caracterização mais detalhada.

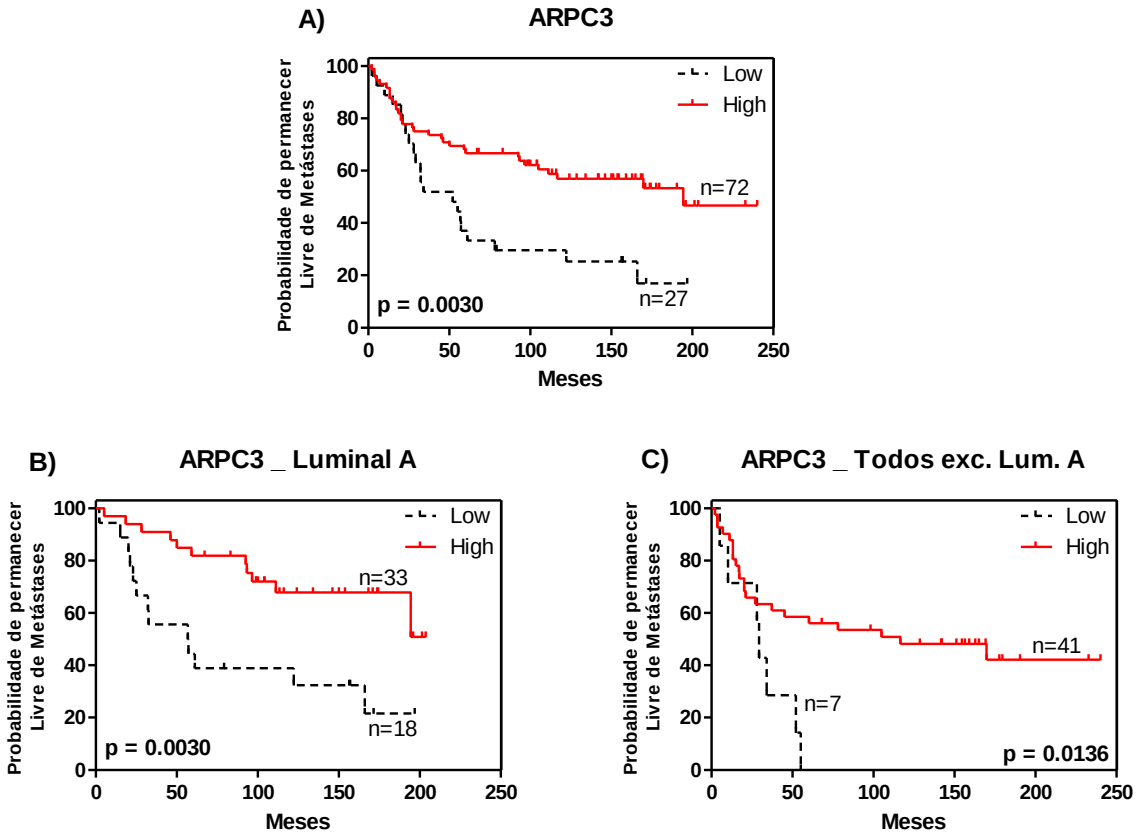


Figura 17: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de ARPC3. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase no conjunto total dos pacientes estudados (Valor de corte de positividade: 0,013). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,014). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,007). Em A foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos B e C

4.6. CIP4

4.6.1. A expressão de CIP4 está diminuída no subtipo Luminal A

Ao analisar os genes *ITGAV* e *ARPC3*, previamente apresentados, verificamos que a expressão de suas proteínas pode predizer diferentes comportamentos biológicos de acordo com o subtipo molecular do tumor. De alguma forma, o subtipo tumoral parece criar um contexto bioquímico para propiciar diferenças nos níveis de expressão de genes analisados. O conjunto de imagens da figura 18A mostra padrões de imunomarcação de CIP4 representativos dos 4 subtipos tumorais abordados. Com o intuito de verificar se a expressão de CIP4 varia entre os diferentes subtipos tumorais, montamos o gráfico apresentado na figura 18B. Os resultados indicam que o subtipo luminal A possui menor expressão de CIP4, quando comparado aos subtipos *Basal-Like* e HER2+ (Figura 18B). Como comentado anteriormente, Luminal A é o subtipo de melhor prognóstico, geralmente lesões de baixo grau e responsivo a tratamentos hormonais por possuir receptores ER e PR (Rakha et al. 2010). O gráfico mostrado na figura 18C mostra a dispersão dos valores de positividade para CIP4 na categoria Luminal A. Os casos com positividade maior do que 0,7 compreendem um grupo mais homogêneo do que aquele com a positividade inferior a esse valor. O ponto de corte 0,7 para a positividade de CIP4 determinado pelo programa X-tile separou o conjunto das amostras com subtipo Luminal A aproximadamente ao meio (Figura 18C).

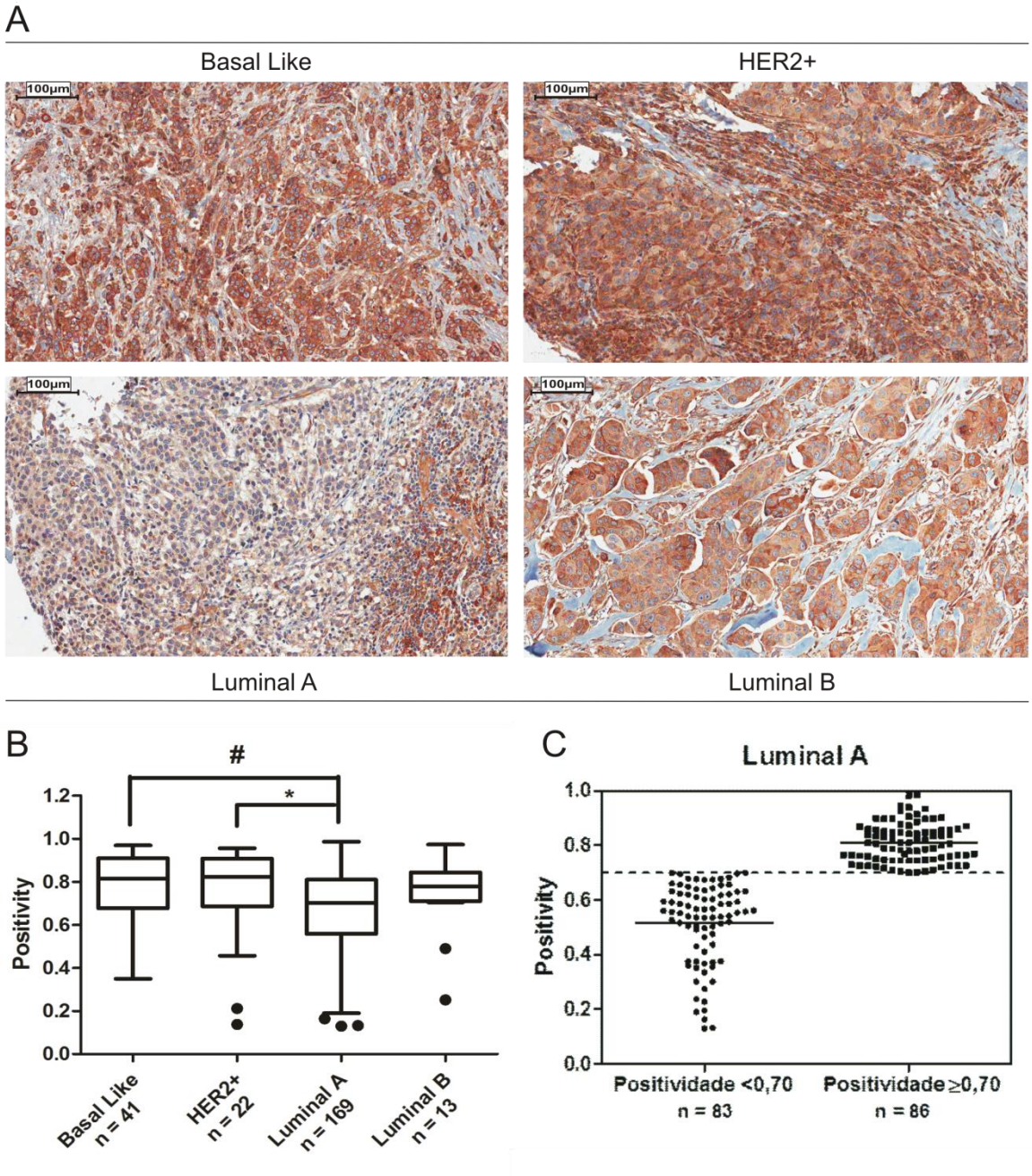


Figura 18 Padrão de expressão de CIP4 em diferentes subtipos moleculares de carcinoma de mama. A) Imagens representativas de casos de cada subtipo molecular e sua respectiva marcação imunohistoquímica de CIP4. **B)** Gráfico mostrando mediana e desvio padrão das positividades para CIP4 de acordo com o subtipo molecular do carcinoma mamário. **C)** Gráfico mostra a dispersão dos valores de positividade para CIP4 na categoria Luminal A, considerando valores acima ou abaixo de 0,7.

4.6.2. Expressão de CIP4, sobrevida e probabilidade de desenvolvimento de metástases

Assim como realizado para os genes previamente apresentados, fizemos análises para investigar a expressão de CIP4 e sua relação com a sobrevida e probabilidade de desenvolvimento de metástases. O conjunto de gráficos apresentados na figura 19 apresenta o resultado de análises da associação da expressão de CIP4 e a sobrevida das pacientes acometidas por câncer de mama. O gráfico de Kaplan-Meyer da figura 19A mostra a sobrevida global das pacientes, analisando todos os subtipos tumorais simultaneamente, em função da expressão de CIP4. Não há relação estatisticamente significante entre a expressão de CIP4 e a sobrevida global das pacientes, considerando o melhor ponto de corte indicado pelo Algoritmo *X-Tile* (0,85). No entanto, quando consideradas apenas os óbitos relacionados a câncer, observa-se que pacientes com expressão de CIP4 aumentada são os mais acometidos (Figura 19B).

Considerando que o subtipo molecular Luminal A tem expressão reduzida de CIP4, interrogamos como seria a curva de sobrevida desses casos em função de suas respectivas positividades. Uma vez que as amostras com subtipo Luminal A apresentam em média valores menores de positividade quando comparadas aos demais subtipos, a adoção do mesmo ponto de corte determinado a partir das amostras de todos os subtipos (0,85), não seria o mais apropriado para os casos desse subconjunto amostral. Dessa maneira, recorremos novamente ao *X-Tile* para determinar o ponto de corte mais adequado para o conjunto de amostras subtipo Luminal A, que foi observado em 0,7. Na curva de sobrevida construída com este valor de corte observamos que, dentre os casos Luminais A, aqueles que apresentam menor expressão de CIP4 são os mais acometidos por óbito devido à

doença (Figura 19C). Novamente, observamos uma inversão entre a tendência de sobrevida de acordo com a expressão do candidato a biomarcador nos pacientes do subtipo Luminal A e o conjunto total de pacientes analisados. Abordaremos conjuntamente os candidatos que apresentaram esta característica no item DISCUSSÃO. Fizemos ainda curvas de Kaplan-Meyer para analisar a sobrevida em todos os pacientes com exceção de Luminal A e apenas naqueles com subtipo tumoral *Basal like*. Não foi observado em nenhum dos casos associação significativa entre a expressão de CIP4 e a sobrevida das pacientes (Figuras 19D e 19E).

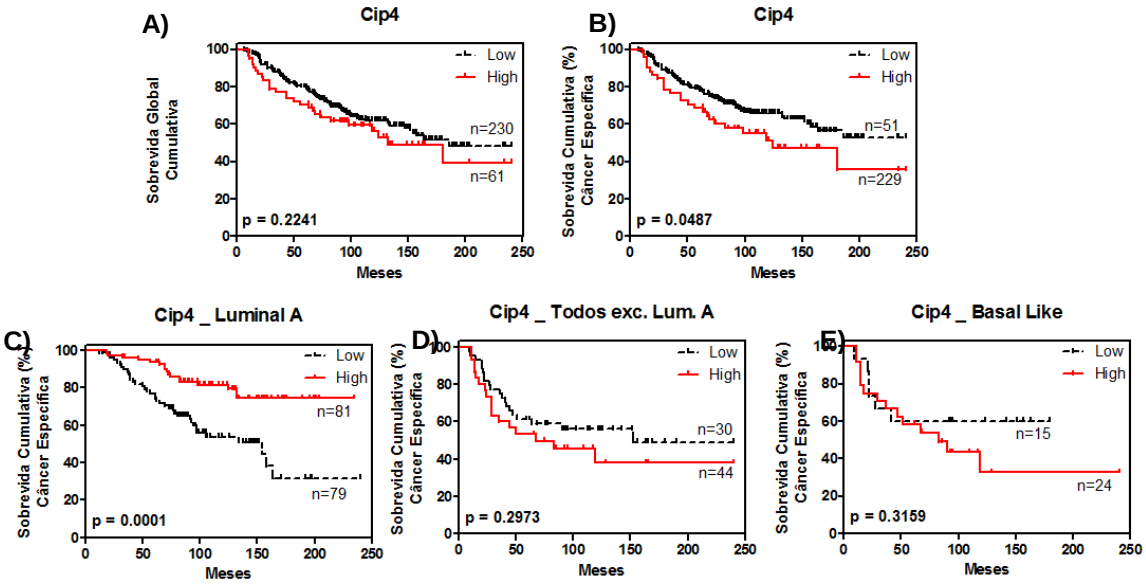


Figura 19: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de CIP4. A) Curvas de Kaplan-Meyer com a sobrevida global das pacientes em função da imunomarcação de CIP4. Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. Não foram observadas diferenças significativas nas sobrevidas entre grupos de pacientes com maior ou menor imunomarcação de CIP4 (valor de corte de positividade: 0,85). **B)** Sobrevida câncer específica (valor de corte de positividade: 0,86). Pacientes com maior positividade de CIP4 mostraram maiores taxas de óbito pela doença. **C)** Sobrevida câncer específica considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A (valor de corte de positividade: 0,7). A curva de Kaplan-Meyer indica que nesses pacientes, os que possuem menor expressão de CIP4 apresentaram maiores taxas de óbito pela doença. O que contrasta ao observado na análise com todos os subtipos combinados. **D)** Curva de Kaplan-Meyer mostrando que nos demais subtipos moleculares, que não Luminal A, não há associação entre a imunomarcação de CIP4 e a sobrevida câncer específica (Valor de corte de positividade: 0,85)**. E)** Sobrevida câncer específica considerando apenas casos do subtipo *Basal Like.* Não se observa diferenças significativas entre a imunomarcação de CIP4 e a sobrevida câncer específica neste subtipo tumoral (valor de corte de positividade: 0,78). Em A e B foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos C, D e E

Em seguida prosseguimos com análises para avaliar a associação entre o nível de expressão de CIP4 e a probabilidade de desenvolvimento de metástases após a cirurgia (Figura 20). Inicialmente, foi feito uma curva de Kaplan-Meyer para analisar a incidência de desenvolvimento de metástase nas pacientes, independente do subtipo tumoral, em função da positividade para CIP4. De uma maneira geral, as pacientes que apresentaram maior expressão de CIP4 foram as mais acometidas por metástases (Figura 20A). Levando em consideração que a maior parte das pacientes é classificada como Luminal A, decidimos investigar amostras com este subtipo tumoral separadamente. Inicialmente foi utilizado o mesmo ponto de corte determinado a partir do conjunto total de amostras. Entretanto, este corte não evidenciou diferenças significantes entre a expressão de CIP4 e a incidência de metástases nas amostras Luminal A, possivelmente porque o número de casos com positividades superiores a 0,87 é muito baixo (dado não mostrado). Dessa forma, recorremos ao *X-Tile* para determinação do ponto de corte ótimo para as positividades de CIP4, medidos nas amostras subtipo Luminal A, que foi determinado em 0,7. Como pode ser visto no gráfico da figura 20B, os pacientes Luminais A com positividade inferior a 0,7 possuem maior probabilidade de desenvolver metástases após 5 anos da remoção do tumor. Curiosamente, verificamos a inversão da chance de recaída em metástases em função da expressão de CIP4 nas amostras subtipo Luminal A (Figura 20B), em relação as análises realizadas com o conjunto total de amostras de todos os subtipos (Figura 20A). Finalmente, realizamos a análise de tempo de desenvolvimento de metástase em função da imunomarcação de CIP4 para aquelas pacientes dos demais subtipos que não Luminal A (Figura 20C). Apesar de não apresentar significância estatística, a curva mostra uma tendência concordante à encontrada para todos os subtipos

agrupados simultaneamente (Figura 20C e Figura 20A). O subgrupo de amostras de pacientes do subtipo *Basal Like* também foram analisadas separadamente, mas não foram encontradas evidências que nos permitem inferir que a expressão de CIP4 relaciona-se com a probabilidade de desenvolvimento de metástase neste subtipo (Figura 20D).

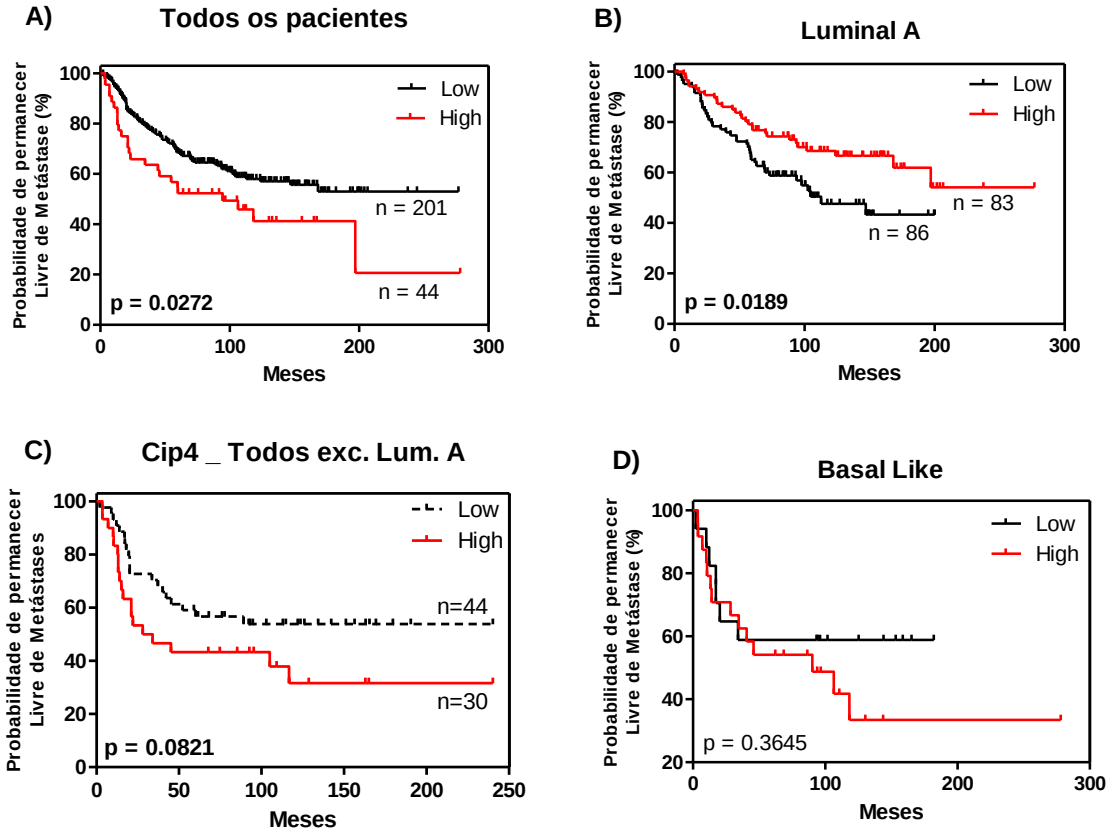


Figura 20. Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de CIP4. **A)** Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase (Valor de corte de positividade: 0,87). Nesta análise foram considerados todos os subtipos moleculares da coorte de estudada. Pacientes com maior expressão de CIP4 mostraram maiores probabilidade de desenvolvimento de metástases. **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,70). Observou-se que, os pacientes do subtipo luminal A que apresentam menores positividades para CIP4 são mais susceptíveis ao desenvolvimento de metástases do que aqueles com maior positividade. O que inverte a tendência observada para todos os subtipos analisados conjuntamente, mostrada anteriormente. **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,85). **D)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo *Basal Like* (Valor de corte de positividade: 0,80). Em A foram incluídos pacientes não caracterizados quanto ao subtipo molecular. Estes não foram considerados nos gráficos B, C e D.

Investigamos ainda a associação entre a imunomarcação de CIP4 e parâmetros clínicos e anatomopatológicos dos pacientes com tumor de mama. A tabela 1 mostra o resultado da análise univariada de correlação entre a positividade de CIP4 e características dos pacientes. Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a imunomarcação de CIP4 e o status de expressão de HER2 ($p = 0,025$) e estadiamento SBR (0,009).

Tabela 3: Associação entre a imunomarcação de CIP4 e parâmetros clinico-patológicos

		Numero de casos		
		CIP4		
Variável	Total (n = 245)	Positividade <0,87 (n = 201)	Positividade >0,87 (n = 44)	*p*-value [a]
Idade				0.084
range 24 - 55 anos	127	99 (49%)	28 (64%)	
range 56 - 92 anos	118	102 (51%)	16 (36%)	
anos, media (± s.d.)		56.1 (±0.90)	54.8 (±1.77)	
Estrogênio				0.409
Negativo	71	56 (28%)	15 (34%)	
Positivo	174	145 (72%)	29 (66%)	
Progesterona				0.861
Negativo	114	93 (46%)	21 (48%)	
Positivo	131	108 (54%)	23 (52%)	
HER2				**0.025**
Negativo	210	177 (88%)	33 (75%)	
Positivo	35	24 (12%)	11 (25%)	
Status Hormonal				0.109
Pré	91	70 (35%)	21 (48%)	
Pos	154	131 (65%)	23 (52%)	
TNM				0.097
I – II	152	130 (65%)	22 (51%)	
III – IV	92	71 (35%)	21 (49%)	
n.d. [c]	1			
SBR				**0.009**
1	37	35 (18%)	2 (5%)	
2	141	118 (59%)	23 (52%)	
3	66	47 (24%)	19 (43%)	
n.d. [c]	1			
Linfonodos				0.508
Negativos	86	73 (36%)	13 (31%)	
Positivos	157	128 (64%)	29 (69%)	
Incidência metástase				0.060
Não	137	118 (59%)	19 (43%)	
Sim	108	83 (41%)	25 (57%)	

4.6.3. CIP4 tem a expressão aumentada em linhagem celular metastática de câncer de mama e se localiza focalmente na membrana celular

Com o intuito de investigar a variação da expressão de CIP4 em linhagens celulares de câncer de mama com diferentes potenciais de formação de metástase, medimos sua expressão em 4 linhagens: i) não tumoral (MCF10A), ii) tumoral não metastático (MCF7) e iii) tumorais com potencial metastático (MDA-MB-231 e HS578T). As células foram cultivadas de acordo com recomendações para cada linhagem e foram coletados amostras de RNA e extratos proteicos de três diferentes réplicas cultivadas independentemente. Para quantificação dos transcritos de CIP4 foram realizados PCR em tempo real com *primers* específicos, conforme descrito na seção MATERIAL E MÉTODOS.

Foi observado que a linhagem tumoral metastática MDA-MB-231 acumula aproximadamente 2 vezes mais transcritos de CIP4 do que a linhagem não tumoral MCF10A e quase 3 vezes mais do que a linhagem tumoral não metastática MCF7 (Figura. 21A). *Westerns blots* feitos com os extratos proteicos coletados das mesmas linhagens confirmaram a presença de maiores níveis da proteína CIP4 na linhagem MDA-MD-231 (Figura 21B e 21C). De forma similar aos níveis de RNA, os níveis proteicos de CIP4 estão elevados na linhagem MDA-MB-231 em comparação às MCF10A e MCF7.

Os experimentos de imunofluorescência corroboraram o resultado de que CIP4 encontra-se super-expresso na linhagem MDA-MB-231, demonstrando adicionalmente que a proteína concentra-se focalmente na membrana celular desta linhagem (Figura 22). É possível observar que em algumas células CIP4 colocaliza-

se com os filamentos de Actina (marcados por faloidina) que margeiam o arcabouço de sustentação à membrana celular (Figura 22).

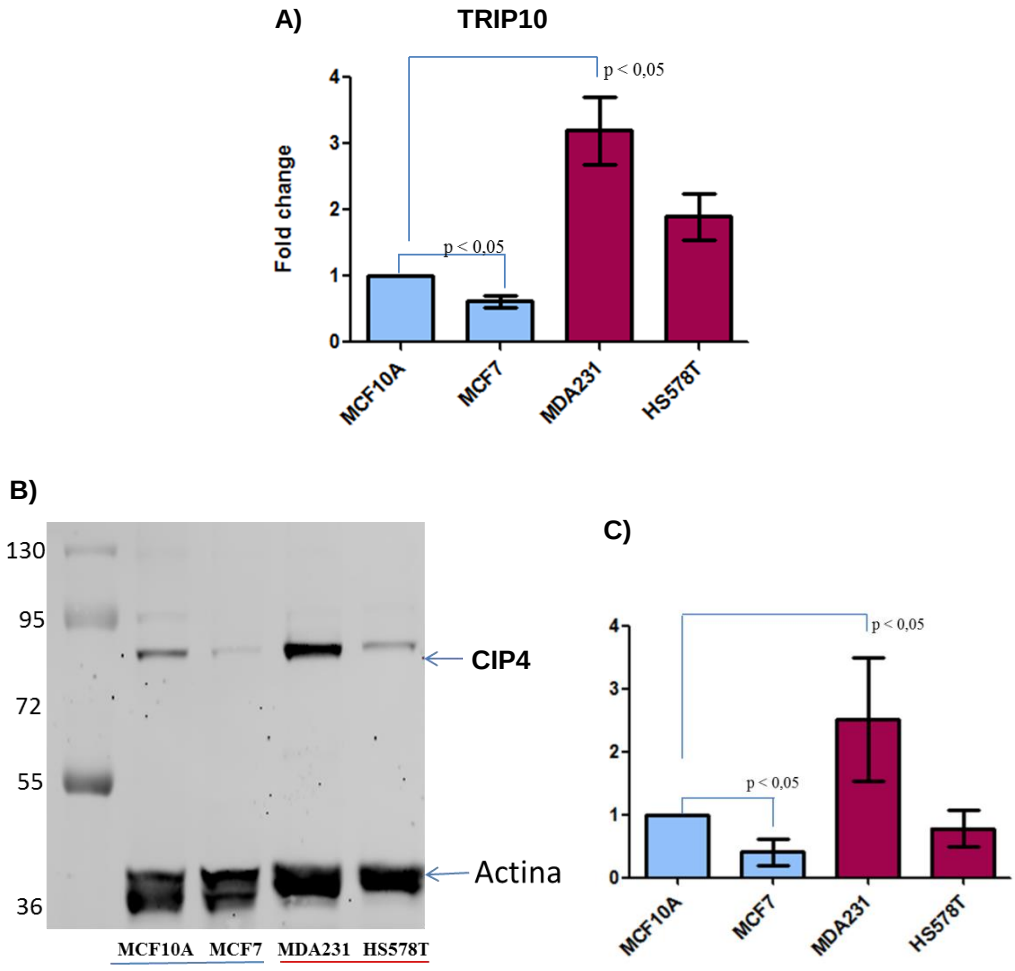


Figura 21. A quantificação relativa de transcritos de gene *TRIP10* por PCR em tempo real e a sua proteína (CIP4) por Western blot. A) Gráfico mostra, por meio de PCR em tempo real, um aumento significativo da expressão do gene *TRIP10* em linhagens mesenquimais/metastático, em especial na linha de MDA-MB-231 quando comparados às linhagens epiteliais/não metastáticas MCF7 e MCF10A. **B)** *Western blot* mostrando a imunodetecção da proteína CIP4, como indicado pela seta superior. As bandas obtidas foram a massa molecular estimada de 75 kDa. A seta inferior refere-se a bandas de actina, as quais foram utilizadas como normalizador. **C)** Gráfico representa a intensidade relativa de CIP4 nas respectivas linhagens celulares às quais tiveram seus extratos proteicos submetidos à *Western blot* . Houve maior quantidade da proteína na linhagem mesenquimal/metastática MDA-MB-231 quando comparada linhagens epiteliais/não metastático MCF7 e MCF10A. Gráfico resultante de valores obtidos por 3 ensaios independentes.

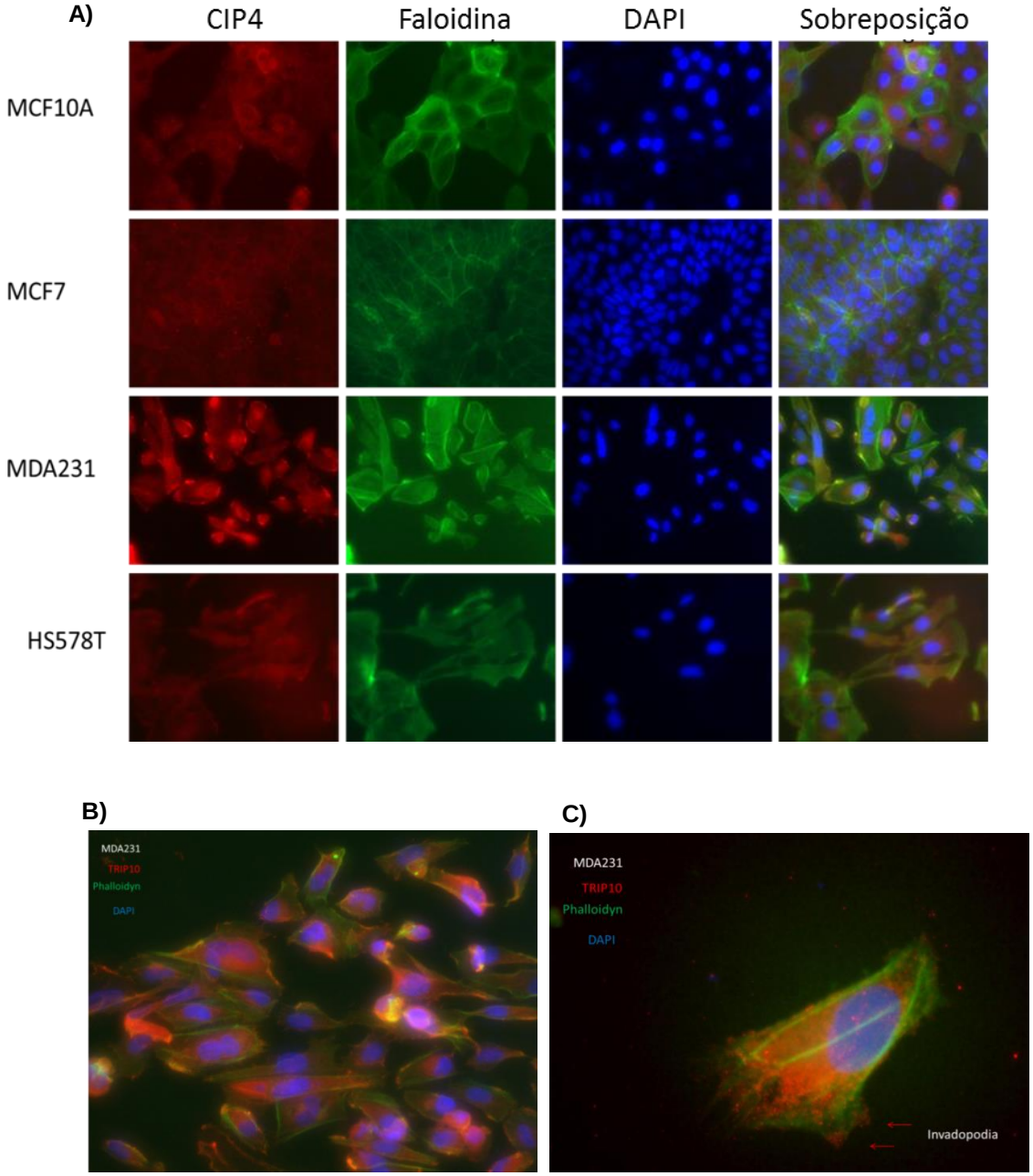


Figura 22. Detecção de CIP4 por imunofluorescência em linhagens celulares de mama com diferentes graus de malignidade. A) Painel mostra imagens de imunofluorescência de CIP4 nas quatro linhagen celulares testadas. A coloração vermelha está relacionada com CIP4 e a coloração verde mostra F-actina marcada com Faloidina conjugada a FITC. Os núcleos das células foram marcadas com DAPI, conferindo cor azul. Comparativamente, é possível perceber que a linha de coloração MDA-MB-231 mostra maior intensidade quando comparado a outras linhagens. O que é consistente com as medições efetuadas em *Western blot* (Figura 21c). Além disso, podemos observar que a marcação de CIP4 em células MDA-MB-231 ocorreram em regiões adjacentes à membrana plasmática de co-localização, os filamentos de actina. As imagens foram adquiridas com lente objetiva de 20x. **B)** Fotomicrografia mostrando a localização subcelular de CIP4 em células MDA-MB-231 obtidas com lente objetiva de 40x. **C)** Fotomicrografia mostrando a localização subcelular de CIP4 em células MDA-MB-231 obtidas com lente objetiva de 100x (imersão).

4.6.4. Células mioepiteliais expressam CIP4 em ácinos normais

Células mioepiteliais são fundamentais para a homeostase e manutenção da estrutura de ácinos, sendo referidas na literatura como responsáveis por exercer um papel supressor de metástases. Portanto, decidimos investigar o perfil de expressão de CIP4 neste tipo celular. O conjunto de imagens a seguir foram selecionadas de amostras representadas no TMA com tumores de mama marcado com anti-CIP4, que ilustram diferentes momentos da progressão tumoral. No painel A podemos observar epitélio mamário histologicamente normal, formando ácinos circundados por células mioepiteliais que expressam CIP4 em níveis significativos. As células luminais expressam níveis menores de CIP4 quando comparadas às células mioepiteliais (Figura 23A). No painel B, podemos observar uma lesão *in situ*, onde células mioepiteliais são escassas e tem menor expressão de CIP4, acompanhadas de células alveolares displásicas com núcleos hipercromáticos e polimórficos. No entanto, as células neoplásicas ainda guardam resquícios de sua arquitetura tecidual, com seus grupamentos celulares inteiramente circundados pela matriz extracelular, típicas de lesões *in situ*. Nota-se a presença de infiltrado inflamatório em áreas adjacentes à lesão (Figura 23B). No painel C, é apresentada uma imagem de carcinoma ductal invasivo onde se observa uma extensa área do estroma invadida pelas células neoplásicas. Há forte expressão de CIP4 nessas células, sobretudo nas áreas da borda da lesão. As células permanecem agrupadas (Figura 23C). Finalmente, no painel D é mostrado uma imagem de carcinoma ductal invasivo onde pode-se visualizar pequenos grupamentos de células neoplásicas, acompanhadas de muitas células individualizadas, com alta expressão de CIP4. O tecido conjuntivo aparenta estar completamente tomado por células invasivas (Figura 23D). Células epiteliais não são vistas nos casos de invasão (23C e 23D) e, em ambos os caos há abundante expressão de CIP4.

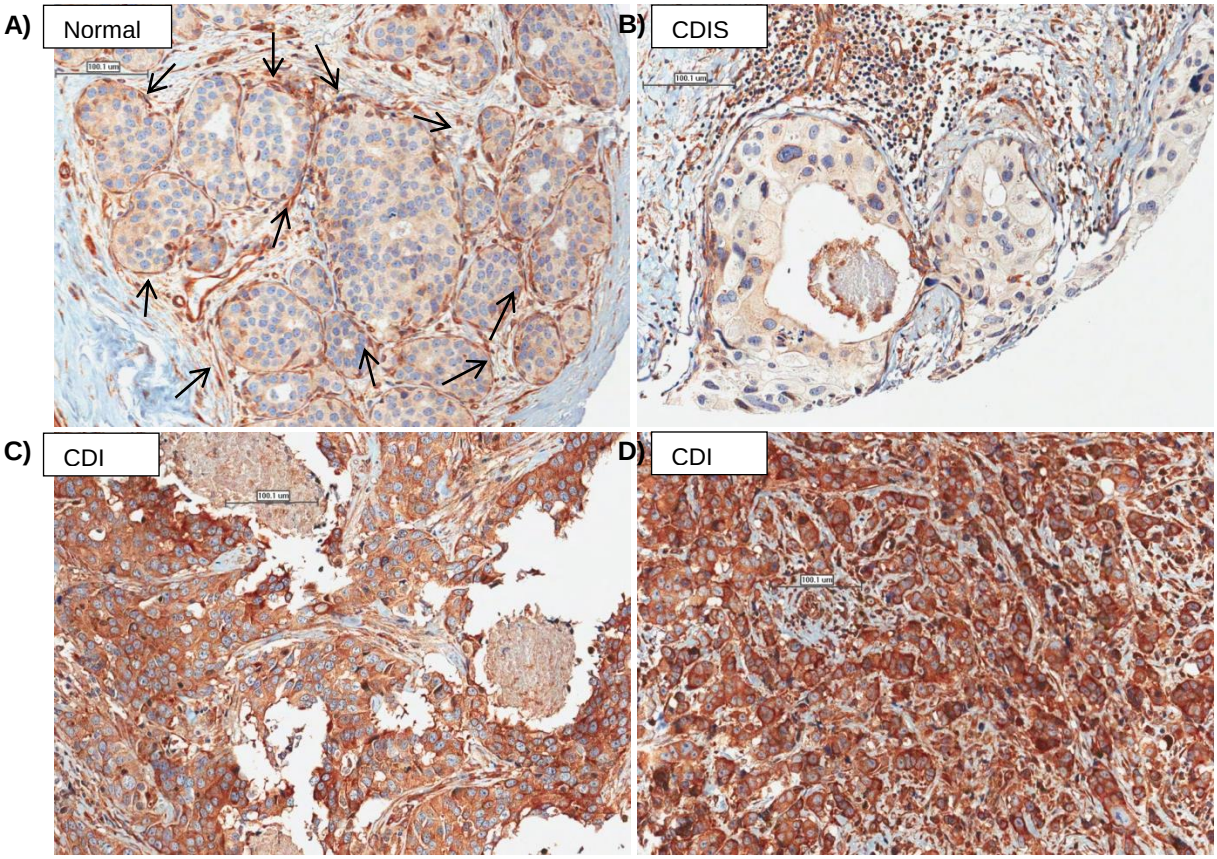


Figura 23. Imunomarcação de CIP4 em diferentes estágios de progressão do carcinoma de mama. **A)** Fotomicrografia mostrando que em ácinos normais, as células luminais estão circundadas por células mioepiteliais (indicadas por setas), que por sua vez expressam CIP4 em proporções superiores às células luminais. **B)** Fotomicrografia mostrando componente epitelial mamário com carcinoma ductal *in situ* (CDIS). Apesar de não apresentar invasão, observa-se a redução do número de células mioepiteliais com a típica expressão de CIP4. **C)** A Fotomicrografia demonstra infiltração difusa do estroma mamário por carcinoma ductal invasivo (CDI). É notável o enriquecimento de CIP4 nas bordas da lesão. Não são observadas células mioepiteliais. **D)** Outro caso de carcinoma ductal invasivo, onde é possível visualizar células tumorais com forte imunomarcação de CIP4 invadindo o estroma mamário. A presença de CIP4 é vista no espaço perinuclear e nas bordas da membrana plasmática. Barras laterais no canto superior esquerdo indicam 100 µm.

4.6.5. O silenciamento estável e regulado de CIP4 não altera a expressão de seus parálogos Toca1 e FPB17

Para investigar o papel de CIP4 em processos celulares como migração, invasão e geração de metástases, células MDA-MB-231 foram transduzidas com partículas lentivirais contendo sequencias que codificam RNAs contendo grampos (*short hairpins* RNAs – shRNAs) que após processados pela maquinaria de RNAi da célula alvejam o mRNA de CIP4 levando ao seu silenciamento. Após a transdução, este sistema permite a expressão condicionada à presença do indutor doxiciclina em meio de cultura celular. O resultado de um experimento de *Western blot* mostrado na figura 24A indica que o silenciamento de CIP4 indutível por Dox foi mais efetivo com a concentração final 2 µg/mL, condição que foi utilizada nos experimentos subsequentes.

Com intuito de verificar a especificidade do silenciamento induzido pelo shRNA, investigamos a expressão de genes parálogos de CIP4 pertencentes a mesma família F-BAR (TOCA-1 e FPB17). Os mesmos extratos proteicos foram analisados por *western blot* com anticorpos contra TOCA-1 e FPB17. A figura 24B mostra que tanto TOCA quanto FPB17 não são afetadas pelo silenciamento de CIP4. Este resultado indica que o fenótipo resultante do silenciamento de CIP4 é estritamente relacionado a esta proteína e não de seus parálogos.

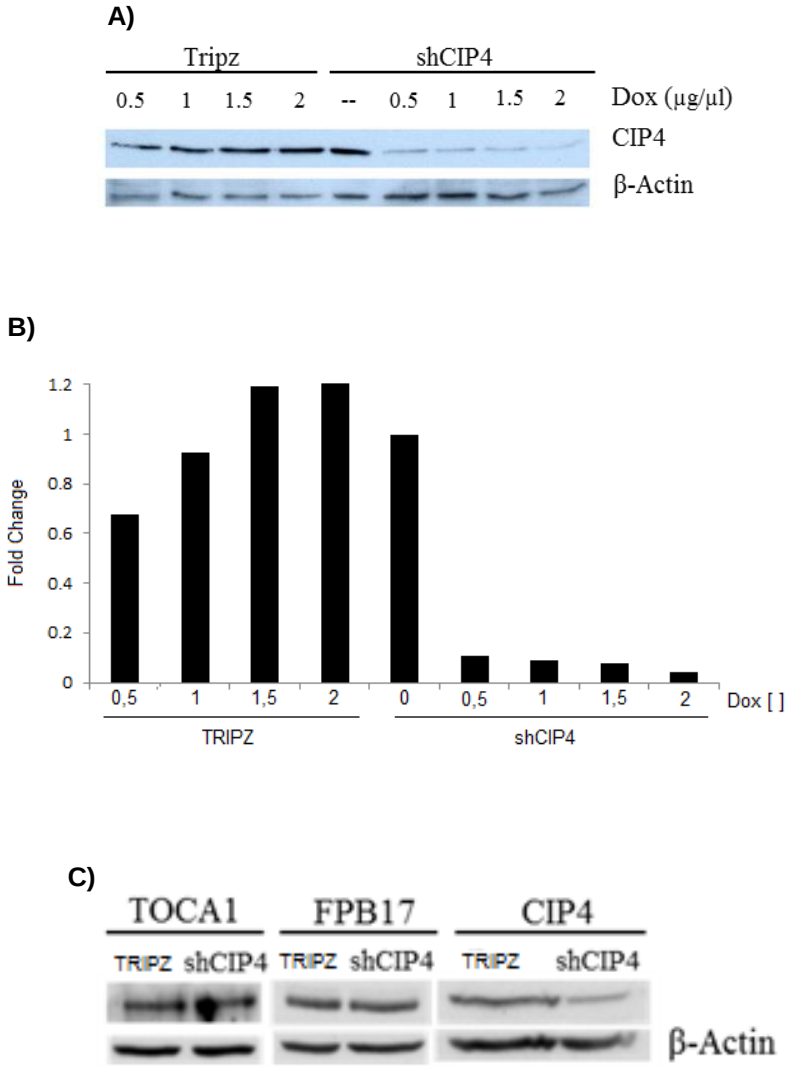


Figura 24. Silenciamento indutível de CIP4 e seu efeito sobre a expressão dos seus parálogos TOCA1 e FPB17. A) Células da linhagem MDA-MB-231 transduzidas com lentivírus carreando o vetor vazio (TRIPZ) ou vetor contendo shRNA contra CIP4 (shRNA) foram tratadas com Doxiciclina e extratos celulares foram analisados por *Western blot* para quantificação dos níveis de CIP4. A indução da expressão dos shRNAs foi testada com 4 concentrações de Doxiciclina, 0.5, 1, 1.5 e 2µg/µl. **B)** Gráfico mostrando a redução da abundância de CIP4 nas células shCIP4 de acordo com a concentração do indutor doxiciclina. Utilizando 2ug/ul de doxiclina, a redução de CIP4 foi de 95.8%. **C)** *Western blot* para detecção de TOCA1, FPB17 e CIP4 em extratos de células transfectadas com vetor vazio (TRIPZ) ou vetor contendo shRNA contra CIP4 (shRNA) e mantidas na presença de Doxiclina.

4.6.6. Depleção de CIP4 reduz a fosforilação de MAPK-p38

Diversos estudos relacionam CIP4 ao controle de exposição de EGFR na membrana citoplasmática (*trafficking*) (Hu et al. 2009), bem como às vias de transdução de sinal bioquímico a jusante a EGF (Pichot et al. 2010; Hu et al. 2011; Saengsawang et al. 2012; Malet-Engra et al. 2013). Com o intuito de investigar as vias de transdução de sinal bioquímico afetadas pela depleção de CIP4, investigamos a fosforilação de um painel de proteínas envolvidas na transdução de sinal intracelular EGFR e seus efetores (Akt e MAPK-p38), após o estímulo com EGF (Figura 25). Para isso, coletamos extratos celulares nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8 e 16 minutos após o tratamento com EGF. Em seguida, foi determinada a quantidade relativa da proteína total (EGFR, Akt e p38) e suas formas fosforiladas (pY-EGFR-p, pT388-Akt e pY-p38) através de *western blot* (Figura 25A). A expressão e acúmulo de formas fosforiladas das diferentes proteínas na presença de níveis endógenos de CIP4 (células transfectadas com vetor Tripz vazio) ou em células com CIP4 depletado (shCIP4) foram quantificadas por densitometria óptica e normalizadas por actina (Figura 25B). Observamos que a fosforilação de EGFR (pY-EGFR) é mais intensa quando CIP4 esta silenciada quando comparada ao controle Tripz (Figura 25, pY-EGFR). Os níveis de EGFR total também parecem estar aumentados durante a depleção de CIP4 (Figura 25, EGFR). A fosforilação de Akt parece se manter mais tardiamente na ausência de CIP4 quando comparada ao controle Tripz (Figura 25, p-Akt [T388]). Isso sugere uma maior duração no efeito desta fosforilação. A fosforilação da MAPK-p38 encontra-se reduzida nas células com depleção de CIP4 (Figura 25, p-p38). Na condição controle (TRIPZ) o acúmulo de fosfo-p38 (p-p38) acontece a partir dos 4 minutos após a adição de EGF. Porém, o mesmo não é observado quando CIP4 está silenciada (shCIP4).

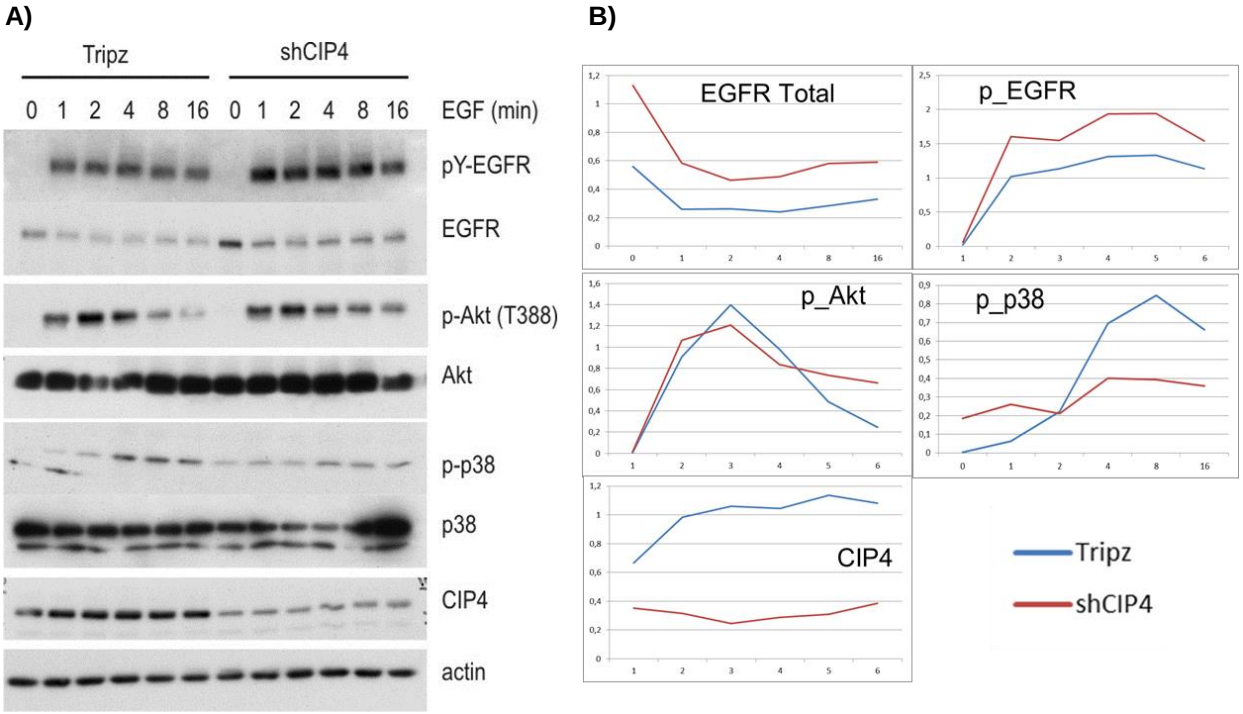


Figura 25. Efeito do silenciamento de CIP4 sobre a ativação de componentes da via de transdução de sinal de EGF. A) Painel de *western blots* realizado com extratos totais de células MDA-MB-231 com depleção de CIP4 (e seu controle TRIPZ) coletadas em diferentes tempos de tratamento com EFG. Além da fosforilação no próprio receptor EGFR (topo), foram investigados Akt e p38, dois principais componentes na transdução de sinais bioquímicos da estimulação do receptor de EGF. N painel inferior, pode ser visualizada os níveis de depleção de CIP4, comparada ao controle. **B)** Gráficos mostrando a quantificação das bandas correspondentes a EGFR total, EGFR fosforilada (p_EGFR), Akt fosforilada (p_Akt), MAPK-p38 fosforilada (p_p38) e CIP4 detectadas em **A**), normalizadas pela banda de actina detectada em cada amostra.

4.6.7. CIP4 modula positivamente a expressão da metaloproteinase MMP2

Os efeitos do silenciamento CIP4 sobre a fosforilação de MAP-p38 nos levou a investigar se houve anormalidades nos níveis de metaloproteinases (MMP). Coletamos o meio condicionado resultante do tratamento com TGFβ e submetemos à análise pelo kit "Human MMP multiplex platform" (Eve Technologies). Esta análise revelou que, durante o silenciamento de CIP4, houve uma drástica redução dos níveis de MMP2 presente no sobrenadante de cultura (Figura 26A).

Para definirmos como CIP4 regula os níveis de MMP2, realizamos a medição de seus transcritos por qRT-PCR durante a depleção de CIP4. Como pode ser observado na figura 26C, durante a depleção de CIP4 houve uma redução de aproximadamente 50% nos níveis de transcritos de MMP2, quando comparada às células com níveis normais de CIP4 (TRIPZ). Entretanto, CIP4 não influenciou a transcrição de MMP-9. Isso nos levou a deduzir que a redução dos níveis proteicos podem estar relacionadas com a diminuição da expressão de MMP2. Em conjunto, esses resultados sugerem que CIP4 promove a expressão de MMP2 e isso pode ser intermediado pela via de sinalização de MAPK-p38.

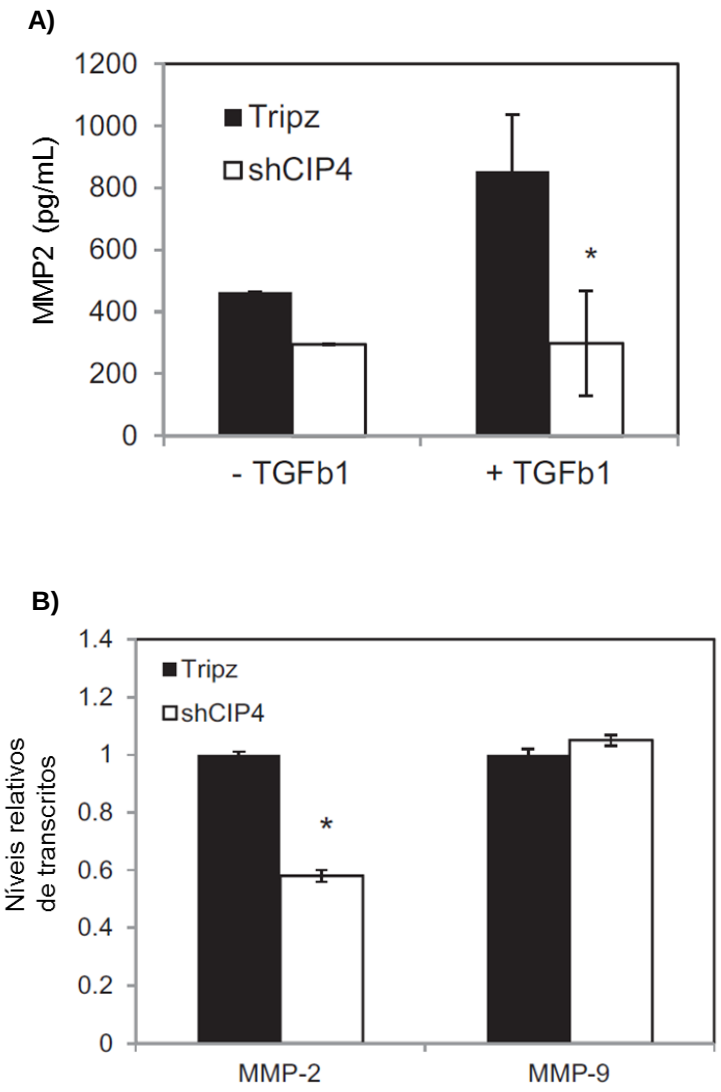


Figura 26. CIP4 promove a expressão de MMP2. A) Imunodetecção das proteínas MMP2 nas células MDA-MB-231 com ou sem silenciamento de CIP4, antes e após o tratamento com TGF-β. Os valores de abundância relativa foram obtidos utilizando o kit de ELISA "Human MMP multiplex" (Eve Technologies). **B)** Expressão relativa dos transcritos de MMP2 em células MDA-MB-231 com (shCIP4) ou sem (Tripz) o silenciamento de CIP4. O RNA total foi isolado e analisado por qRT-PCR usando *primers* específicos MMP2 e MMP-9, sendo normalizados pela expressão de GAPDH. Todos os experimentos foram realizados 3 vezes de maneira independente. (* ($P < 0.05$)).

4.6.8. CIP4 regula positivamente a migração e invasão de células MDA-MB-231 *in vitro*

Um estudo publicado na literatura demonstrou, usando silenciamento transiente (siRNAs), que CIP4 está envolvido na migração e invasão invasão *in vitro* da linhagem celulaer maligna MDA-MB-231 (Pichot et al. 2010). Porém outro trabalho utilizando silenciamento estável demonstrou resultados contrários ao trabalho de Pichot e colaboradores (Hu et al. 2011). Para investigar essa aparente discrepância, e verificar a contribuição de CIP4 no processo de migração e invasão celular nós usamos neste trabalho um sistema de silenciamento por shRNA baseado em lentivírus (TRIPZ) que permite o silenciamento indutível pela adição de doxiclina.

Os ensaios de *wound healing* foram realizados como descrito na seção "MATERIAL E MÉTODOS". Com uma ponteira p200, foi feito uma raspagem numa monocamada de células e fotografados com 0, 12 e 18 horas (Figura 27A). As imagens mostram uma redução na área de células migradas com CIP4 silenciado (shCIP4), quando comparado a controle vetor vazio (TRIPZ). As áreas de migração foram medidas e representados em gráfico de barra mostrando que houve aproximadamente 60% de redução na capacidade migratória em células com CIP4 silenciada (Figura 27B).

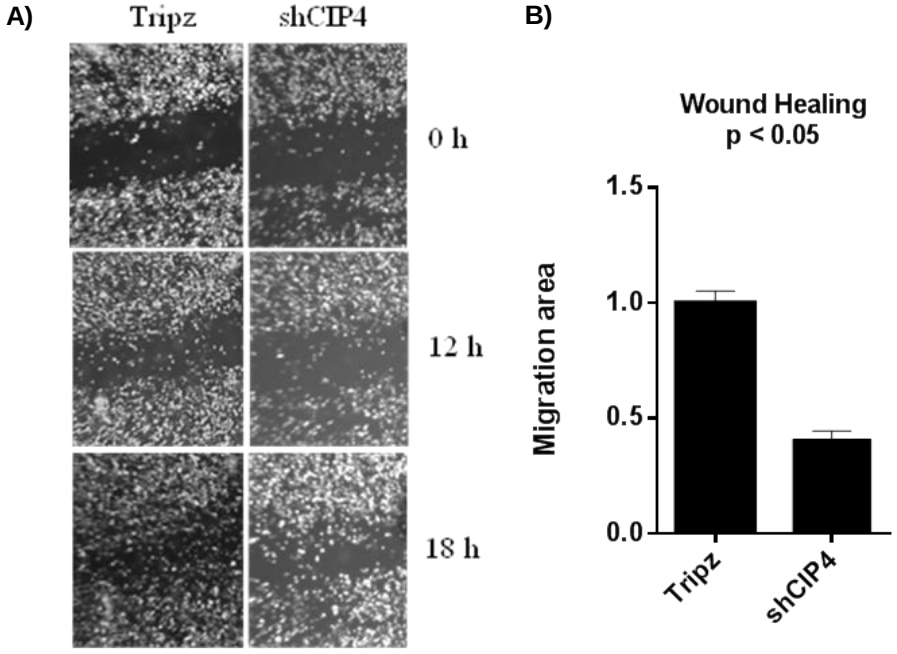


Figura 27. O silenciamento de CIP4 na linhagem MDA-MD-231 reduz as taxas de migração e invasão *in vitro*. A) Imagens representativas do ensaio *wound healing* realizado nas células MDA-MB-231 com silenciamento de CIP4 e respectivo controle TRIPZ. As células foram semeadas e cultivadas até atingir a completa confluência, quando a monocamada foi riscada e imediatamente fotografada (tempo 0). Em seguida retornadas para a incubadora e novamente fotografadas após 12 e 18 horas. **B)** Gráfico comparando as medidas da área de migração após 12 horas, medidas em três réplicas experimentais. As células com o silenciamento de CIP4 apresentaram redução na capacidade migratória de aproximadamente 60%.

Em seguida, avaliamos a capacidade migratória de células tumorais de mama na presença e ausência de CIP4 utilizando câmaras *transwell*. As células foram semeadas no compartimento superior de câmaras *transwell* com poros de 8µm em meio de cultura na ausência de soro fetal bovino (SFB), enquanto o compartimento inferior recebeu meio de cultura completo (10% de SFB), como estímulo para a migração. Após 12 horas de incubação, estes *transwells* foram fixados e corados com DAPI para a quantificação de células que migraram para a superfície inferior da membrana. Corroborando os ensaios de *wound healing*, o silenciamento de CIP4 diminuiu a migração da linhagem celular MDA-MB-231

(Figura 28A). Este resultado foi observado em três ensaios independentes e corresponde a aproximadamente 50% de redução.

A seguir, expandimos esta análise para invasão celular em matrigel usando a mesma câmara *transwell*, como descrito na seção MATERIAL E MÉTODOS. Contrastando com ensaio de migração em *transwell*, o ensaio de invasão oferece uma barreira física à movimentação das células de um compartimento para o outro, mimetizando a lâmina basal, que neste caso foi utilizado Matrigel. Além de barreira à movimentação celular, esta camada de matriz evidencia o potencial que as células possuem em degradar ativamente os componentes desta matriz. Nossos resultados indicam nas células com depleção de CIP4 ocorreu aproximadamente 50% de redução da invasão de Matrigel, em comparação ao controle TRIPZ (Figura 28B).

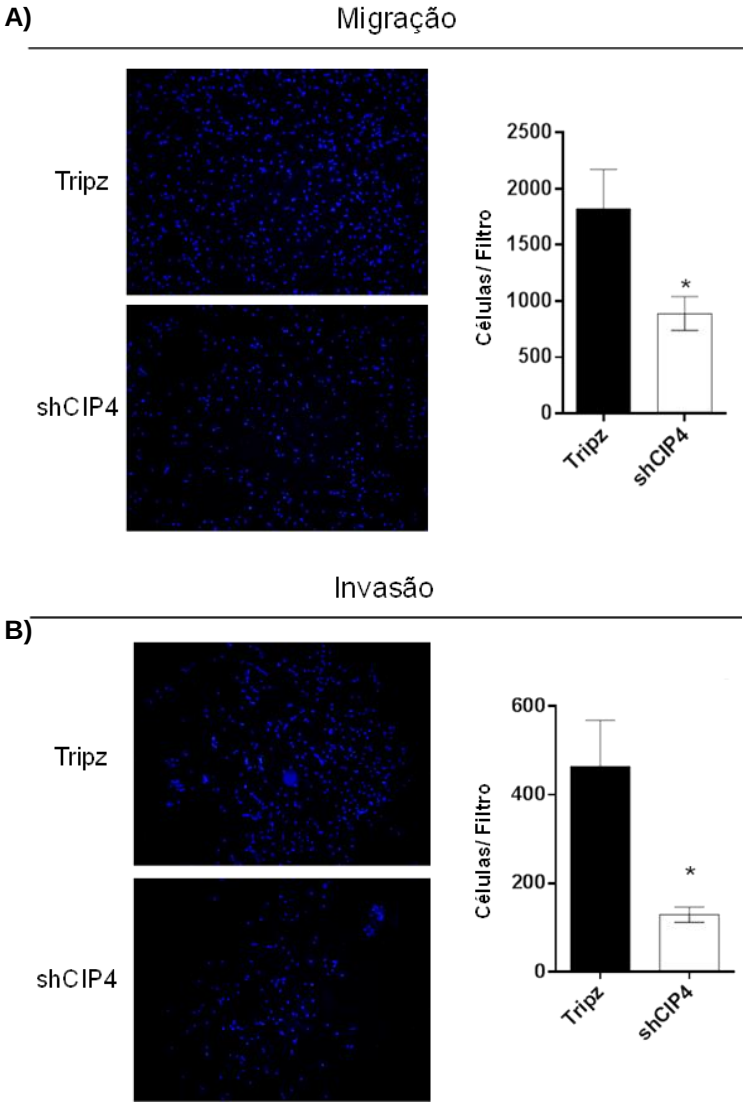


Figura 28. CIP4 é um modulador positivo da migração e invasão celular em cultura. A) Ensaio de migração medido em câmaras *transwell* com poros de 8µm. Células transduzidas com vetor vazio (Tripz) ou vetor contendo shRNA contra CIP4 (shCIP4) foram semeadas na parte do superior do *transwell* suspensas em meio de cultura carenciado (sem soro) e na presença de doxicliclina. Na parte inferior do *transwell* foi adicionado meio de cultura completo (10% soro fetal bovino). As células que migraram a parte superior foram contadas e seu número representado no gráfico de acordo com o grupo experimental. Observou-se redução de aproximadamente 50% da capacidade migratória em células com CIP4 silenciada (12 campos contendo acima de 100 células; ensaio feito em triplicata; significância s.e.m; *student's test (P<0.05)). **B)** Ensaio de invasão de matrigel in vitro utilizou das mesmas condições descritas em A, porém, foi adicionada uma camada de 20% de matrigel a parte superior do *transwell* de modo a oferecer uma barreira física às células. As células capazes de invadir esta camada de matrigel e colonizar a parte inferior do Transwell foram fotografadas, contadas e seu número representado no gráfico. As células com CIP4 silenciadas apresentaram uma redução superior a 50% na capacidade invasiva silenciada (12 campos contendo acima de 100 células; ensaio feito em triplicata; significância s.e.m; **student's test* (P<0.05)).

Ensaios de invasão celular *in vitro* em *transwell* falham em mimetizar as condições fisiológicas que ocorrem *in vivo*. Para tentar contornar essa limitação, utilizamos o sistema de invasão celular em esferoides tridimensionais. Este sistema oferece uma condição um pouco mais realista, ao proporcionar as células formação de agregados, aumentando assim as interações célula-célula e ainda possibilitando total imersão à matriz extracelular. Os resultados indicam que há redução da área de invasão em células com o silenciamento de CIP4 (Figura 29A e B), o que é concordante com o ensaio de invasão em *transwell* realizado anteriormente (Figura 28B). A redução na área decorrente no silenciamento de CIP4 é de aproximadamente 50% quando comparada ao controle TRIPZ (Figura 29B).

Em conjunto estes resultados apontam CIP4 como um regulador positivo na promoção da migração e invasão em células humanas de câncer de mama.

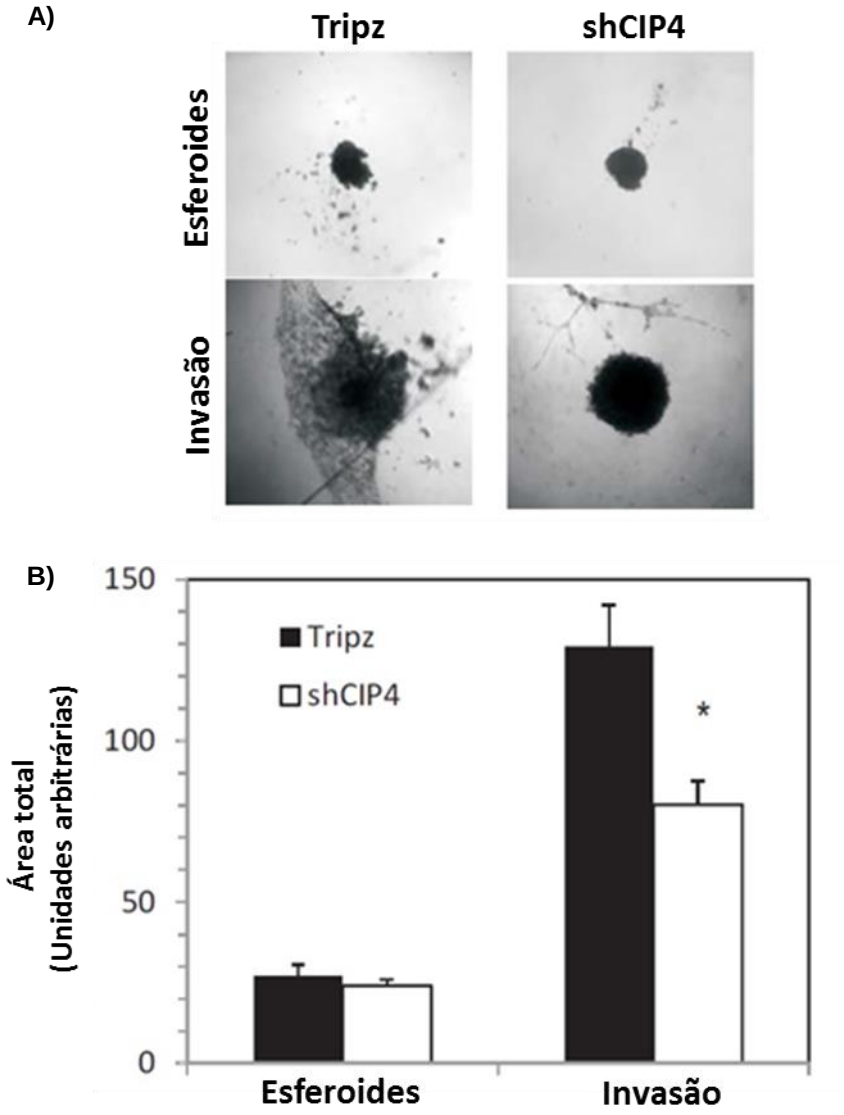


Figura 29. Silenciamento de CIP4 reduz as taxas de invasão em modelos tridimensionais de cultura de células. A) Fotomicrografias representativas do ensaio de invasão dos esferoides 3D. Acima são vistos os esferoides antes do estímulo à invasão, e abaixo 6, dias após o início do estímulo. **B)** Gráfico representando as diferenças nas áreas de invasão nas diferentes condições estudadas. A depleção de CIP4 mostrou redução significativa na área de invasão. Significância s.e.m; **student's test* (P<0.05)

4.6.9. O silenciamento de CIP4 reduz a incidência de metástases em pulmões de camundongos Rag2$^{-/-}$γC $^{-/-}$

Para estudar a contribuição de CIP4 para a propagação de metástases *in vivo*, conduzimos experimentos em camundongos fêmeas Rag2$^{-/-}$ γc$^{-/-}$ com 5-7 semanas de idade. Culturas de células MDA-MB-231 transduzidas com o vetor vazio (TRIPZ) ou vetor contendo o shRNA contra CIP4 (shCIP4), com e sem indução de doxiclina, foram injetadas no *fat pad* da mama desses animais. Este modelo é muito útil na compreensão da disseminação de metástase (Le Devedec et al. 2009). A doxiciclina foi adicionada à ração dos animais para induzir a expressão do shRNA *in vivo*, assim como do gene repórter TurboRFP presente no vetor lentiviral. Após 4 semanas os animais foram sacrificados para coleta do tumor primário e observação de metástases pulmonares. Foi medida a massa do tumor primário, onde observamos que não houve diferenças significativas entre tumores formados em animais inoculados com células contendo o vetor vazio (TRIPZ) ou vetor com shCIP4, na presença ou ausência de Doxiclina (Figura 30B). Em seguida, os tumores primários foram macerados e os extratos totais foram analisados por *western blot*. Observou-se o silenciamento sustentado de CIP4 *in vivo* após 4 semanas do inóculo inicial com a manutenção de Dox na dieta (Figura 30A). Este achado demonstra que o silenciamento de CIP4 não resulta em maior crescimento do tumor primário. A figura 3C apresentra imagens representativas dos tumores primário. As lesões apresentam-se como hipercoradas em roxo e não aparentam conter diferenças na morfologia e extensão das lesões (Figura 30C).

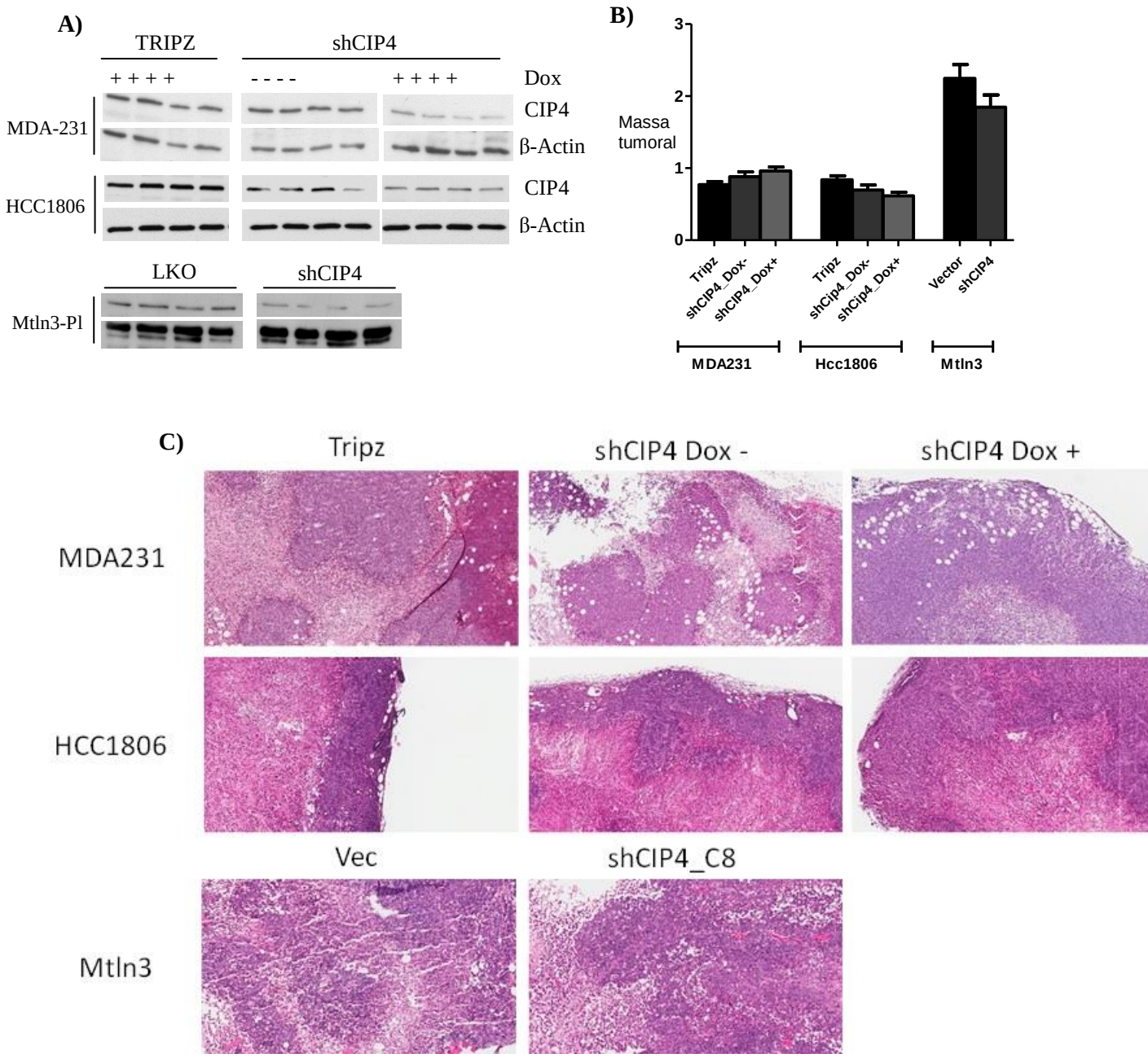


Figura 30. CIP4 não está relacionado com as taxas de crescimento do tumor primário nas mamas de camundongos Rag2-/-γc- fêmeas. A) *Western blot* de lisados de tumores primários camundongos fêmea Rag2$^{-/-}$γc$^{-/-}$ sujeitos a injeção intra-mamária de MDA-MB-231, HCC1806 e Mtln3-PL com CIP4 silenciadas e seus respectivos controles. A droga doxiciclina foi adicionada à dieta e ao fim de 4 semanas de crescimento tumoral, CIP4 permaneceu silenciado. **B)** Gráfico mostra a massa tumoral, em gramas, dos tumores dos camundongos Rag2$^{-/-}$γ$^{-/-}$. Não houve diferenças significativas entre os grupos controle e shCIP4_Dox + ($p > 0,05$). **C)** Imagens representativas demonstrando que o tumor primário em diferentes linhagens celulares utilizadas não evidenciaram diferenças de crescimento ou diferenças morfológicas entre os controles shCIP4 e respectivos controles.

Durante a disseminação de metástases, a independência de ancoragem no lúmen de vasos, extravasão desses e colonização pulmonar são estágios finais do processo (Figura 4B). Com o intuito de simular estas etapas tardias à disseminação de metástases, as células das linhagens celulares descritas (Figura 30A) foram injetadas na veia caudal de camundongos $Rag^{-/-}$ $\gamma C^{-/-}$. Após 4 semanas esses animais foram eutanasiados, tendo seus pulmões coletados e submetidos a cortes histológicos e coloração por H&E. O conjunto de Fotomicrografias mostra os nódulos de metástases pulmonares (marcados pelas setas pretas) e evidencia que não há diferenças no número e extensão dessas (Figura 31A). O gráfico mostra medidas resultantes de 3 ensaios independentes, que demonstram não haver diferenças entre a formação de metástases pulmonares a partir de injeções de células pela veia caudal (Figura 31B). Tomadas em conjunto, esses dados indicam que a depleção de CIP4 não interfere em estágios finais da geração de metástases.

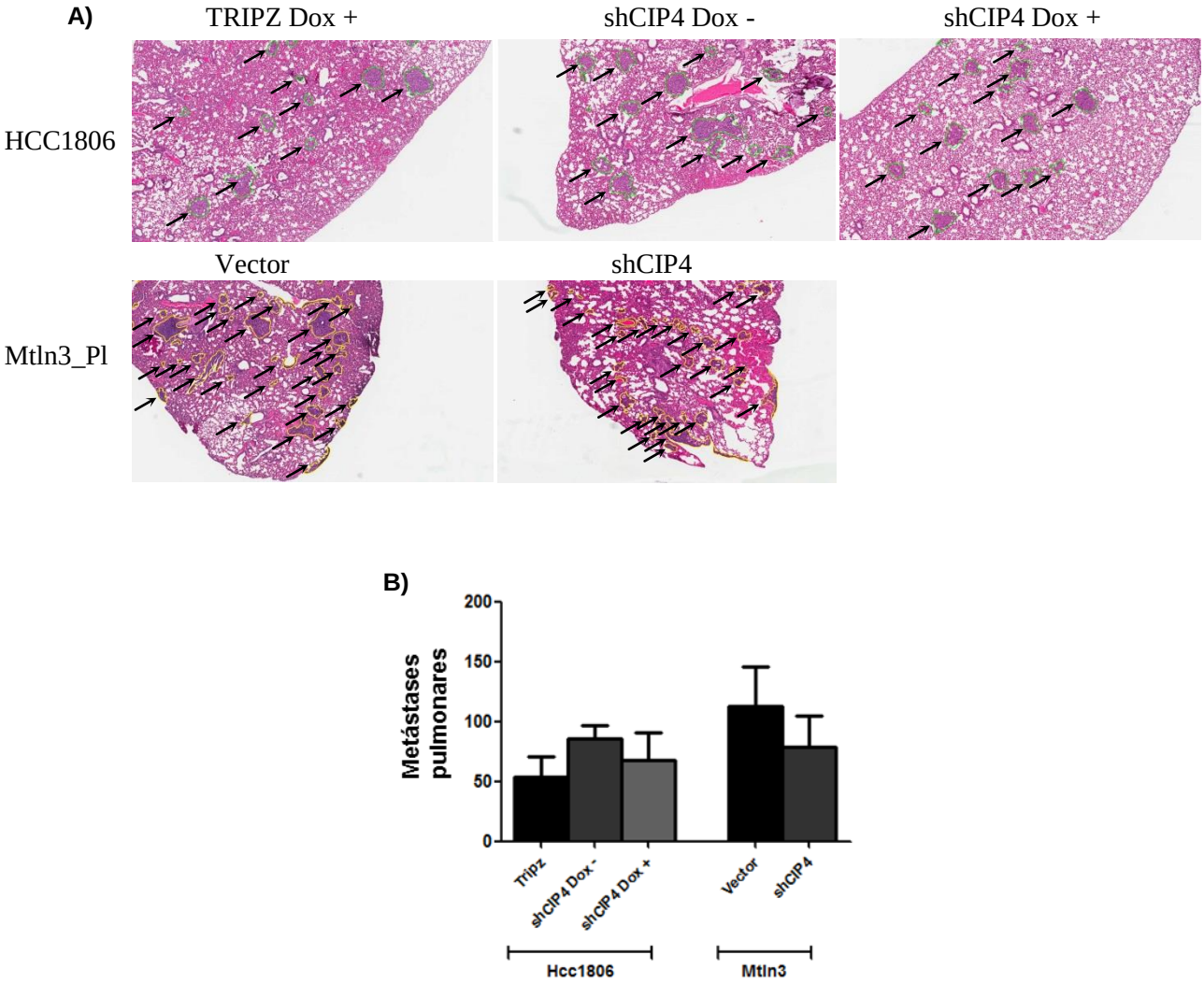


Figura 31. CIP4 não está relacionado com as taxas de aparecimento de metástases a partir de células tumorais circulantes administradas pela veia caudal em camundongos RAG2$^{-/-}$ γC$^{-/-}$. A) Imagens representativas dos pulmões que indicam o número e extensão destas metástases (setas pretas). Em ambos, controle e shCIP4, há formação do mesmo número de metástases do pulmão, indicando que CIP4 influência apenas os estágios iniciais da disseminação de metástases. **B)** Gráfico mostra o número de metástase do pulmão nos respectivos grupos. As análises estatísticas foram realizadas e não mostra diferenças significativas entre shCIP4 e respectivos controles ($p > 0,05$).

Finalmente, o potencial de geração de metástases foi avaliado no modelo de camundongos Rag2 $^{-/-}$ γc $^{-/-}$. As células foram preparadas e inóculadas via intra-mamária. Passadas 4-5 semanas, os animais foram sacrificados e os pulmões foram examinados em um microscópio de epifluorescência, buscando a presença metástases positivas para a expressão de TurboRFP (ou GFP na linhagem Mtln3-PL). A análise inicial dessas Fotomicrografias mostrou um reduzido número de metástases nos pulmões dos animais que receberam células com CIP4 silenciada, quando comparadas aos respectivos controles (Figura 32A). Análises posteriores utilizaram secções destes tecidos pulmonares corados com hematoxilina-eosina para quantificação de metástases. Animais que receberam células com CIP4 silenciada mostraram uma diminuição significativa no número de metástases pulmonares (Figura 32B). Imagens representativas destes grupos mostram a presença de destas metástases no parênquima pulmonar. As setas indicam a quantidade e localização destas metástases de acordo com o grupo experimental. (Figura 32C). Tomados em conjunto, nossos dados indicam que CIP4 é um potente modulador do processo metastático.

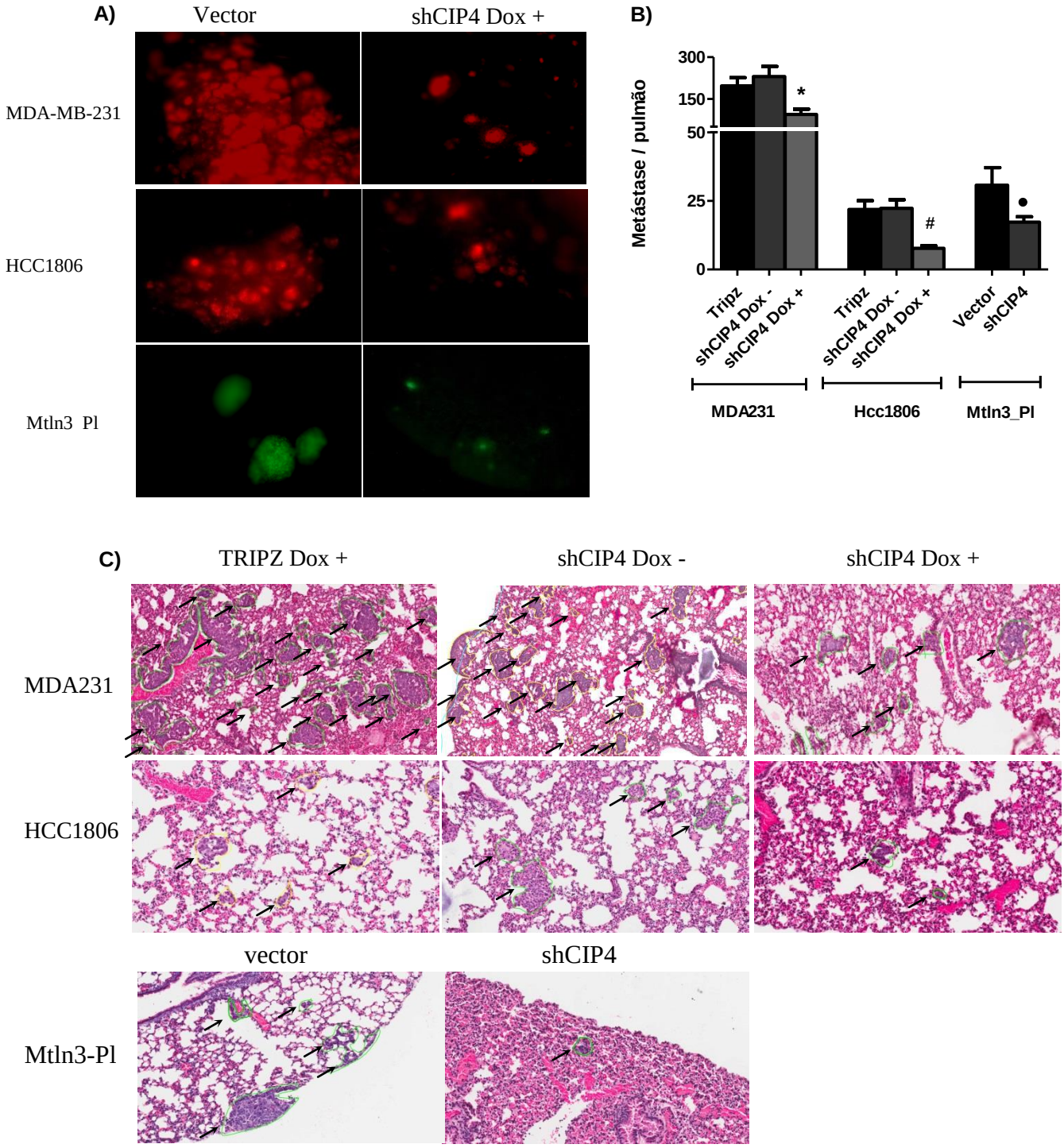


Figura 32. O silenciamento de CIP4 reduz as taxas de disseminação de metástases no pulmão de camundongos Rag2$^{-/-}$γC$^{-/-}$. A) Fotomicrografias de epifluorescência em pulmões de camundongos Rag2-/-γc. As metástases, que são TurboRFP ou GFP (em Mtln3-Pl) positivos, estão indicadas na figura. Há uma redução significativa no número de metástases nas células com CIP4 silenciados em todas as linhagens celulares testadas. **B)** Gráfico mostra o número de metástases encontradas em cortes de pulmão de camundongos Rag2$^{-/-}$γc$^{-/-}$, corados com H&E (* Anova, p=0.0092 média + - no, N = 24 animais; # Anova, p=0.0055 média + - no, N = 12 Animais, ● T test, p=0.0675 média + - no, N = 14 Animais). **C)** As fotomicrografias de cortes representativos dos pulmões de camundongos fêmeas Rag2$^{-/-}$γc$^{-/-}$ coradas com H&E como o grupo experimental (setas indicam as posições das metástases).

5. DISCUSSÃO

Um dos maiores desafios para o tratamento do carcinoma de mama resulta da enorme heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas (Page et al. 1998; Sorlie et al. 2001; SCHMITT 2008). A classificação morfológica (anátomo-patológica) atualmente utilizada é insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estádio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia (Elston and Ellis 1991; Reis-Filho et al. 2006; SCHMITT 2008). As limitações na classificação morfológica, em grande parte, são devidas à incapacidade de distinguir as características moleculares destes tumores (Van De Vijver et al. 2002; Putti et al. 2004; SCHMITT 2008).

Neste trabalho, tivemos como o ponto de partida um estudo de expressão gênica em larga-escala em tumores de mama (Canevari et al., dados não publicados), para a escolha de 8 genes candidatos a marcadores de prognóstico e predição de metástases. Nosso objetivo inicial era validar esses candidatos, que foram identificados como diferencialmente expressos em experimentos com microarranjos de DNA, utilizando outra metodologia, que desta vez, mede a abundância proteica por IHQ em lâminas de TMA. Foram utilizados blocos de TMAs já montados e previamente estudados durante a tese de doutorado da Dra. Monica Maria Stiepcich (Stiepcich 2007). Em seu trabalho, cortes histológicos desses TMAs foram utilizados em reações de IHQ para pesquisar a expressão de diferentes marcadores tumorais já conhecidos, dentre os quais os receptores ER, PR e HER2, o que nos foi extremante útil pois permitiu classificar as amostras de acordo com

subtipos moleculares já descritos (Rakha et al. 2010), e assim, poder agrupar a expressão de nossos candidatos a marcadores de prognóstico

Dessa forma, priorizamos três abordagens para os estudos com TMAs, que serão discutidas abaixo: i) avaliar se os resultados de imunomarcação obtidos com TMAs em um conjunto independente de amostras que corroboram os dados de expressão gênica obtidos com microarranjos de DNA ii) investigar a relação entre o nível de expressão proteica dos genes candidatos e a sobrevida / incidência de metástases nos pacientes com carcinoma de mama, e iii) associar os Concentração das proteínas expressas pelos genes candidatos de acordo com os subtipos moleculares do carcinoma de mama.

5.1. TMA como ferramenta de validação do microarranjo de cDNA

Os experimentos com microarranjos de DNA que serviram de base para este trabalho indicou 60 genes diferencialmente transcritos em pacientes que desenvolveram metástases em até 5 anos após a remoção cirúrgica do tumor. A partir da anotação dos genes presentes neste conjunto, selecionamos 8 desses genes como candidatos a biomarcadores de malignidade no carcinoma de mama para serem validados em um conjunto independente de amostras por TMA. Cabe salientar que o microarranjo *de DNA* mediu os níveis de RNAm, enquanto que os ensaios com TMAs estimaram a abundância destas proteínas por método imunoenzimático (IHQ) em amostras de tumores independentes. Para checar se havia concordância entre esses níveis, agrupamos ambos os resultados conforme pode ser observado na tabela abaixo.

Tabela 4. **Associação entre a expressão relativa do mRNA e da proteína codificada pelos genes candidatos a biomarcadores de prognóstico do carcinoma de mama**. Os níveis relativos dos transcritos foram medidos nos microarranjos de DNA. A abundância relativa das proteínas foi medida por TMA utilizando o conjunto total de amostras. Ambos se referem as amostras de pacientes com pior prognóstico.

Gene	**Expressão do mRNA** (microarranjo de DNA)	**Expressão da proteína (TMA)**	
	Metástase	**Sobrevida**	**Metástase**
ARPC3	Aumentado	Diminuido	Diminuido
PPIL1	Aumentado	Diminuido	Sem diferença
AKAP14	Aumentado	Sem diferença	Sem diferença
ITGAV	Aumentado	Sem diferença	Sem diferença
ABCG1	Aumentado	Sem diferença	Sem diferença
FXYD1	Diminuido	Sem diferença	Sem diferença
MICA	Diminuido	Sem diferença	Sem diferença
CIP4	Diminuido	Aumentado	Aumentado

Dos 8 genes escolhidos para validação com TMAs, apenas ARPC3 e CIP4 mostraram associação estatisticamente significativa a abundância das proteínas codificadas pelos genes e o risco do paciente desenvolver metástases. Para o gene ARPC3, os experimentos com microarranjos *de DNA* indicou que o nível de seus transcritos está aumentado nos pacientes que desenvolveram metástases. Contrariamente, os resultados de TMAs sugerem que a abundância proteica de ARPC3 esteja reduzida naqueles pacientes com maior probabilidade de metástases.

Para CIP4, os resultados de microarranjo *de DNA* indicaram níveis de transcritos reduzidos nos pacientes acometidos por metástases. No entanto, sua abundância proteica está aumentada nos pacientes com maior incidência de metástases, conforme os resultados de TMA mostrados na figura 20. Foi também observada maior abundância proteica de CIP4 nos pacientes com menor sobrevida câncer especifica.

Relatos na literatura que compararam em escala global a expressão de mRNAs respectivas proteínas indicam que o coeficiente de correlação encontra-se em torno de 0,4 a 0,5 (Tew et al. 1996; Anderson and Seilhamer 1997). Esta correlação pode ser ainda menor em células tumorais (Tew et al. 1996). Isso sugere que a abundância de mRNA é um “pobre” indicador dos níveis de suas proteínas correspondentes (Tew et al. 1996; Anderson and Seilhamer 1997; Anderson and Anderson 1998; Futcher et al. 1999; Gygi et al. 1999; Pradet-Balade et al. 2001; Greenbaum et al. 2003).

Os níveis de expressão de uma determinada proteína não depende somente das taxas de transcrição do gene, mas também de mecanismos de controle adicionais que atuam ao nível pós-transcricional como a localização e exportação nuclear do mRNA (Lipshitz and Smibert 2000), estabilidade dos transcritos (Belasco and Brawerman 1993), existência de regulação por microRNAs (Bartel and Chen 2004), regulação da tradução (Sonenberg et al. 2000) e a degradação proteica (Bochtler et al. 1999; Kirschner 1999; Voges et al. 1999; David 2013). Desse modo, a detecção de níveis aumentados de transcritos não necessariamente implica que as proteínas irão se acumular nas células em níveis maiores

A determinação dos níveis de mRNA, tanto por métodos em larga escala, como individualmente, podem ser úteis na predição do prognóstico de lesões neoplásicas (Hui et al. 1996; Brase et al. 2010). No entanto avaliar a abundância do mRNA possui limitado valor preditivo para determinar a terapia a ser adotada quando se trata de avaliar a presença de uma proteína necessária para a resposta a um tratamento por exemplo. Por exemplo, o tratamento quimioterápico com anticorpo anti-HER2 (Trastuzumab) só é indicado após verificada a expressão do receptor ao nível protéico (Ithimakin et al. 2013). Essas evidências sugerem que a

medição da abundância proteica tem grande relevância na predição do fenótipo tumoral, especialmente na decisão do tipo de terapia a ser empregada no tumor.

5.2. Relação do nível de expressão proteica dos genes candidatos e a sobrevida / incidência de metástases

Tradicionalmente, a IHC é um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão protéica em anatomia patológica (Camp et al. 2000; Marquez et al. 2004). A possibilidade de interrogar centenas de casos em apenas uma lâmina revolucionou o estudo do perfil molecular no diagnóstico de neoplasias (Zellweger et al. 2003). Descrita pela primeira vez em 1998 (Kononen et al. 1998), a técnica de microarranjos de tecido (TMA) evoluiu e conta hoje com novas metodologias automatizadas para obtenção e análise dos resultados (Camp et al. 2008; Rojo et al. 2010). Algumas dessas ferramentas digitalizam as lâminas de TMA coradas por IHC gerando imagens de alta resolução que podem ser acessadas remotamente em qualquer computador, dispensando o uso do microscópio. Apesar de críticas por parte de alguns patologistas tradicionais, evidências acumuladas na literatura têm demonstrado uma estreita correspondência entre os resultados obtidos a partir da observação tradicional usando o microscópio e a determinação dos valores de imunomarcação utilizando sistemas automatizados (Turbin et al. 2008; Alvarenga et al. 2013). A correta utilização destas tecnologias possui inúmeras vantagens frente ao uso do microscópio, como a eliminação das possíveis variabilidades inerentes à subjetividade ou fadiga do observador, ou de outras interferências relativas à instrumentação como fonte de luz do microscópio, tipos de lentes objetivas utilizadas entre outros (Cregger et al. 2006; Alvarenga et al. 2013; VILELLA-ARIAS 2013).

Neste trabalho, utilizamos a tecnologia fornecida pelo sistema da Aperio, que utiliza o equipamento “ScanScope” para digitalização das lâminas, e posteriormente utiliza ferramentas que integram o sistema “ImageScope” para a extração e processamento de dados (Aperio Inc.).

Uma vez digitalizadas as lâminas, a intensidade de coloração relativa à imunomarcação foi convertida em valores numéricos utilizando o *software* “CountPixel V9” na plataforma "ImageScope". Essa medida de intensidade, denominada "positividade", foi determinada em amostras com diferentes intensidades de imunomarcação, e a comparação com medidas obtidas visualmente no microscópio revelou uma relação direta e proporcional entre as medidas visuais e os valores de positividade (Figura 8A).

Os valores de positividade mostraram-se bastante heterogêneos de acordo com o gene estudado (Figura 8B). Inicialmente tentamos estabelecer, de forma arbitrária, os valores de corte de positividade que possibilitassem a separação dos pacientes em diferentes grupos de riscos. Entretanto, ao perceber a vulnerabilidade desta estratégia frente aos diferentes valores de positividade nos 8 genes analisados, buscamos na literatura e encontramos a ferramenta de análise *X-Tile* (Camp et al. 2004). Esta ferramenta indica o melhor valor de corte (positividade) que permite separar estatisticamente subgrupos de pacientes em função sobrevida e probabilidade de desenvolvimento de metástases (Mazumdar and Glassman 2000; VILELLA-ARIAS 2013).

Estabelecidos esses pressupostos, prosseguimos com a análise dos biomarcadores candidatos. A análise dos candidatos ABCG1, MICA, FXYD1 e AKAP14, não revelou uma associação significativa entre a imunomarcação das

proteínas e a sobrevida dos pacientes ou a probabilidade de desenvolver metástases, e os resultados estão apresentados na seção "ANEXOS". Os candidatos que apresentaram associação estatisticamente significativa com o seguimento clínico do paciente foram apresentados na seção "RESULTADOS" e estão resumidos na tabela abaixo.

Tabela 5: Relação entre a imunomarcação da proteína e a sobrevida câncer específica e probabilidade em desenvolver metástases

Gene	Sobrevida câncer específica	p-Value	Probabilidade em desenvolver metástases	p-Value
PPIL1	MENOR expressão associada a pior prognóstico	0,026	Não significante	0,07
ARPC3	MENOR expressão associada a pior prognóstico	0,033	MENOR expressão associada a pior prognóstico	0,003
CIP4	MAIOR expressão associada a pior prognóstico	0,048	MAIOR expressão associada a pior prognóstico	0,027

Como é possível constatar, a menor expressão da proteína PPIL1 está associada a menor probabilidade de sobrevida câncer específica do paciente, embora não tenha relação significativa com a probabilidade em desenvolver metástase. Analisando o candidato *ARPC3,* observamos que a menor abundância proteica deste, está relacionada a piores chances de sobrevida câncer específica, acompanhada de maior probabilidade de desenvolver metástases. Por outro lado, CIP4 expressa de forma aumentada está relacionada a maior probabilidade de desenvolver metástases, incidindo num pior índice de sobrevida câncer específico.

Nossa abordagem utilizada para a análise dos TMAs, mostrou a correlação entre a abundância das proteínas e parâmetros clínicos de sobrevida e incidência de metástases apenas 2 dos 8 genes analisados. Entretanto, os outros 6, que não apresentaram tais correlações de maneira estatisticamente significantes, podem ter peculiaridades que fogem a maneira como abordamos o problema. Abordaremos

mais essas questões posteriormente, ao falarmos das limitações da abordagem utilizada para validação dos candidatos por TMA (ver item 5.4).

5.3. Concentração das proteínas expressas pelos genes candidatos de acordo com o subtipo molecular do tumor

A classificação dos tumores de acordo com os subtipos moleculares nos permitiu avaliar separadamente o perfil de expressão dos candidatos a marcadores nos principais subtipos representados em nossa amostra e sua possível influência na predição do prognóstico. O subtipo Luminal A como já discutido, expressa os receptores ER e/ou PR mas não expressa HER2, e quando assim classificado o tumor tem indicativo de bom prognóstico (Yanagawa et al. 2012). Alguns genes analisados por TMA neste trabalho mostraram interessantes achados quando discriminados por subtipos moleculares. As curvas de sobrevida das pacientes em função da imunomarcação de ITGAV apresentaram uma inversão de tendência quando o subtipo Luminal A foi contrastado com os demais subtipos (Figura 13C e D). Em Luminal A, a menor abundância de ITGAV está relacionada a menores taxas de sobrevida, enquanto que nos demais subtipos observou-se o oposto. A mesma tendência de inversão para Luminal A é observada nas curvas de probabilidade de desenvolvimento de metástases de acordo com a expressão de ITGAV (Figura 14B e C). É interessante notar ainda que para ITGAV, quando as curvas de sobrevida e de chance desenvolvimento de metástases são analisadas sem a distinção do subtipo Luminal A, ambas não possuem significância estatística (Figura 13B e 14A, respectivamente). Esta peculiaridade do subtipo Luminal A mostrando inversão de tendência da expressão proteica na capacidade de predizer o prognóstico de

sobrevida e de incidência de metástases, também foi observada em outros genes candidatos: ARPC3 e CIP4 ([Figuras 16C,D e 17B,C – ARPC3] e [Figuras 19C,D e 20 B,C – CIP4]). A expressão do gene PPIL1 também apresentou esta tendência inversão para a sobrevida de Luminal A, embora não mostre significância estatística (p=0.0616) (Figura 10C e D).

Os dados apresentados neste trabalho indicam que a expressão de CIP4 está associada ao prognóstico de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo. Com exceção de pacientes com subtipo Luminal A, a maior expressão de CIP4 se correlaciona com uma maior probabilidade de desenvolvimento de metástases. Curiosamente, observa-se uma relação inversa nos pacientes com tumor Luminal A. Apesar disso, o subtipo Luminal A apresentou menor expressão de CIP4 quando comparado os subtipos triplo negativo e HER2+.

As diferenças de expressão observadas entre diferentes subtipos moleculares do carcinoma de mama reforça a ideia de que o valor preditivo da expressão dos marcadores moleculares é maior em combinação, do que considerados individualmente (Rakha et al. 2010). Durante a progressão de tumores do subtipo luminal para os do subtipo *basal-like*, diversas mudanças fenotípica acontecem. Uma das mais impactantes para essas células é o fato de deixar de expressar o receptor ER, que influencia diretamente a expressão de outros genes. Até mesmo a expressão do receptor PR é influenciado por ER (Rakha et al. 2010). Isto implica em diferentes genes sendo expressos, e sendo assim, possivelmente diferentes contextos de sinalização celular devem estar funcionais nos distintos subtipos tumorais. A presença dos receptores ER e/ou PR, uma característica do subtipo Luminal A, sugere que neste contexto a abundância relativa dos biomarcadores

ITGAV, ARPC3 e CIP4 pode estar associada a diferentes comportamentos biológicos do tumor, dependendo da presença ou ausência destes receptores.

5.4. Principais dificuldades e limitações da estratégia adotada para as análises de TMA

Em nossa abordagem para analisar os TMAs, utilizamos a quantificação por IHC para o total de proteínas, não havendo distinção do compartimento celular que estaria localizada. O *software* utilizado (*CountPixel* v.9) quantifica o total de *pixels* das áreas selecionadas para a análise. Isso traz uma importante limitação, pois, é sabido que a localização subcelular da proteína pode se refletir em diferentes contextos de sinalização (Peifer and Polakis 2000; Krieghoff et al. 2006). Foi demonstrado que algumas proteínas quando mudam a sua localização subcelular influenciam alterações fenotípicas dos tumores (Liu et al. 2002; Bettstetter et al. 2005; Haudek et al. 2010). Apesar de existirem ferramentas no sistema *ScanScope* que permitem selecionar apenas a marcação da região nuclear ou citoplasmática, estas necessitam de ajustes que devem obrigatoriamente ser feitos com pelo menos dois patologistas independentes. Infelizmente, não tivemos a oportunidade de validar essas ferramentas da forma adequada, e consequentemente, optamos por não fazer a detecção de imunomarcação de acordo com o subcompartimento celular. A seguir falaremos brevemente a respeito de cada um dos candidatos que tiveram resultados relevantes no que se refere à localização subcelular.

Outra limitação que pode ser apontada na interpretação dos resultados com TMAs é que os anticorpos empregados na IHC não discriminam variantes de *splicing*, mutações e nem modificações pós-traducionais sofridas pelas proteínas. Sabemos que estas nuances podem influenciar grandemente o fenótipo tumoral.

A seguir abordaremos os candidatos a biomarcadores que não apresentaram significância estatística nas curvas de Kaplan-Meier de sobrevida e de incidência de

metástases. Serão abordadas as possíveis razões que possam ter limitado sua correlação com esses parâmetros clínicos. Como já discutido, nossa abordagem adotada nas análises dos TMAs priorizou a quantificação total das proteínas independente de sua localização. Entretanto, neste trabalho procuramos também observar diferenças na localização subcelular destas, embora visualmente e sem o uso de programas de quantificação, listando a seguir nossos principais achados. Além disso, listamos as principais dificuldades e limitações encontradas em cada candidato, que encontram-se ordenados por ordem de relevância.

5.4.1 PPIL1

Em nosso estudo, a proteína expressa pelo gene *PPIL1* mostrou na maioria dos casos, localização citoplasmática. Entretanto, em alguns casos observou-se uma forte marcação nuclear. A Figura 9, exemplifica bem este fenômeno, pois, casos com positividades bem próximas (0,87 e 0,84) apresentam diferentes disposições nucleares destas proteínas. Comparados isoladamente, o caso com maior disposição nuclear de PPIL1 apresentou maior comprometimento linfonodal. Interessantemente, a localização nuclear de PPIL1 foi observada de forma marcante na linhagem celular de mama com maior potencial metastático MDA-MB-231 (ANEXOS: Figura S2).

É importante salientar que as funções descritas de PPIL1 no enovelamento de proteínas, pela isomerização *cis/trans* de seus resíduos de prolina, acontecem não só no citoplasma, mas também são fundamentais para o correto enovelamento de proteínas precursoras de partículas ribonucleoproteícas (snRNP) no spliceossomo (Wang et al. 2010; Hegele et al. 2012). Esta grande e complexa maquinaria de

remoção de introns de pre-RNA, o spliceossomo, é regulada por uma série de etapas e depende da relação de PPIL1 com proteínas SKIP (*Ski Interaction Protein*) que estabilizam ou não a correta sua montagem (Jurica and Moore 2003). Sabe-se que os nucléolos são responsáveis pela maturação das snRNPs que compõem os spliceossomos. A quantidade e forma com que estes nucléolos se dispõem no núcleo mudam de acordo com a malignidade de tumores de mama (Helpap 1989), indicando que a dinâmica destas organelas nucleares estão em constantes transformações no decorrer da progressão tumoral.

Essas evidências nos levam a seguinte indagação: Porque alguns tumores apresentam maiores de taxas de localização nuclear de PPIL1? Estariam envolvidas em algum passo da transformação maligna? Isso poderia ser um indicativo de piora no prognóstico? Estas perguntam não foram aprofundadas nesta tese, representando interessantes perspectivas do trabalho.

5.4.2. AKAP14

Este gene não foi abordado no corpo da tese (RESULTADOS), pois, não apresentou curvas de Kaplan-Meier estatisticamente significantes, na separação de pacientes de acordo com sua abundância proteica e prognóstico de sobrevida e incidência de metástases. O que nos levou a incluí-lo no item ANEXOS. Entretanto, julgamos válido discutir neste sub item pois, também mostrou diferente status de localização. Nossos resultados com TMAs, evidenciaram que no caso de carcinoma ductal *in situ* AKAP14 encontra-se disposto mais acentuadamente na membrana celular, embora tenha uma marcação citoplasmática de menor intensidade (ANEXOS, Figura S17A). Por outro lado, a amostra de carcinoma ductal invasivo

(ANEXOS, Figura S17B) mostrou uma tênue marcação de membrana, moderada marcação citoplasmática e, em algumas células, marcação nuclear. Cabe ressaltar ainda que ambos os casos apresentaram positividades para AKAP14 muito próximas, 0,85 e 0,82 respectivamente. Interessantemente, nossos resultados de imunofluorescência usando linhagens celulares, mostraram a presença de AKAP14 na membrana apenas das linhagens luminais MCF10A e MCF7 (ANEXOS: Figura S18). Ao passo que nas linhagens mesenquimais/metastáticas MDA-MB-231 e HS578T mostraram tênue marcação nuclear, não dispondo dessa proteína em suas membranas celulares.

Há poucos relatos na literatura a respeito de AKAP14, sendo que nenhum deles investiga esta proteína no contexto de neoplasias. Sabe-se que está enriquecida nos axonemas ciliares do trato respiratório modulando a frequência do batimento ciliar (Kultgen et al. 2002). AKAP14, assim como os outros membros desta família de proteínas adaptadoras (AKAP), interagem com Proteína Kinase A (PKA) confinando sua forma ativa em compartimentos celulares específicos, de forma que sua ação seja restrita e não abrangente. Dessa forma, criam-se microgradientes de cAMP de forma heterogênea na célula (Tasken and Aandahl 2004; Carnegie et al. 2009). As diferentes localizações de AKAP14 nos diferentes casos, bem como, nas diferentes linhagens, podem estar refletindo diferentes contextos da sinalização de PKA. Este aspecto não foi explorado neste trabalho de forma mais detalhada.

5.4.3 ITGAV

Esta integrina, também conhecida como CD51 ou receptor de vitronectina, atua como um dos principais receptores de adesão associada a matriz extracelular

(Sims et al. 2000). As forças mecânicas provenientes da adesão de integrinas à matriz extracelular, sendo fundamentais para a organização do citoesqueleto, migração, proliferação e diferenciação celular (Sims et al. 2000; Jiang et al. 2003). Alem disso, tem implicações em muitos processos do desenvolvimento e são alvos terapêuticos para a inibição de angiogênese e da osteoporose (Bader et al. 1998).

Nossos resultados de IHC nos tecidos indicam que na maioria dos casos ITGAV encontra-se na membrana citoplasmática e no citoplasma (Figura 12). É interessante notar que, quando os ácinos normais estão delimitados pela lâmina basal, e consequentemente segregados da matriz extracelular, ITGAV apresenta uma tênue marcação na margem da circunferência acinar (Figura 12A). Esta localização periférica no ácino coincide com a localização esperada das células mioepiteliais, onde estas exercem seus efeitos parácrinos e morfogênicos (ver seção INTRODUÇÂO, Figura 2). Interessantemente, nos casos de carcinoma ductal invasivo por sua vez, a marcação de ITGAV mostrou-se de maneira singular na membrana de cada célula invasiva (Figura 12B e C). Nestas células, talvez o comportamento invasivo faça com as moléculas ITGAV medeiem sua adesão à matriz, para que finalmente migre e invada os tecidos adjacentes.

Nossos resultados de imunofluorescência mostram que na linhagem mesenquimal/metastática HS578T, a proteína ITGAV apresentou uma marcação de membrana, mas de forma semelhante à adesões focais. O que mostrou-se bem diferente do observado para a linhagem luminal MCF10A, onde há o margeamento total, e não em focos, da membrana celular (Figua S4). A disposição de ITGAV encontrada em HS578T é similar ao encontrado na linhagem celular A-431, proveniente de carcinoma epidermoide (*The Human Protein Atlas*, http://www.proteinatlas.org/ENSG00000138448/subcellular). Apesar de muito

interessante e promissores, não investigamos a fundo o porquê dessas diferenças. Entretanto, permanece a perspectiva de investigar mais a respeito dessas diferenças.

5.4.4 MICA

Existem evidências de Lo e colaboradores demonstraram que alguns alelos do gene MICA tornam indivíduos mais susceptíveis ao câncer gástrico (Lo et al. 2004). Enquanto que em outro trabalho, sua importância no prognóstico de câncer esôfago também foi demonstrada (Mei et al. 2012). Foram observados altos níveis de MICA em soros de pacientes com o câncer do colo do útero e lesões precursoras, quando comparados com os indivíduos saudáveis (Arreygue-Garcia et al. 2008). Surpreendentemente, produtos solúveis de MICA desempenham importantes papéis na evasão imune por células tumorais (Kim et al. 2007). Madjd e colaboradores sugiram que a indução da expressão de MICA pode ser um indicativo de mau prognóstico no carcinoma da mama (Madjd et al. 2007).

Ye e colaboradores documentaram por ELISA níveis aumentados da fração secretada de MICA em pacientes com câncer de mama. Nesse estudo, o estádio clinico do câncer de mama foi correlacionado positivamente com o nível de expressão da proteína. Os autores inferiram que a expressão de MICA conferiam propriedades evasivas à resposta imune anti-tumoral (Jemal, Siegel et al. 2008). Foi demonstrado ainda que o aumento dos níveis plasmáticos de MICA reduziu a expressão de NKG2D em linfócitos T e células NK de pacientes com câncer cervical (Arreygue-Garcia et al. 2008).

Nossos resultados com TMA para MICA (ANEXOS: Figura S12) demonstraram diferentes localizações subcelulares para esta proteína. Observou-se a localização citoplasmática na maior parte dos casos (ANEXOS: Figura S12A). Alguns poucos casos apresentaram marcação clara na membrana celular, como observado na figura S12C. Entretanto, o que mais nos chamou a atenção, foi que em alguns casos constituintes do mesmo bloco de TMA, a matriz extracelular estava com forte imunodeposição de DAB, sugerindo que nesta secção houvesse maior presença de MICA secretada. Esses resultados foram discutidos com a equipe de patologistas no Hospital AC Camargo. Apesar da aparente localização de MICA detectada por IHC no microambiente tumoral, o que traria interessantes perspectivas para investigações futuras, técnicas adicionais para confirmação seriam necessárias, objetivando minimização de interferências artefatuais decorrentes da técnica utilizada.

5.4.5. FXYD1

Este gene codifica uma proteína que mais comumente conhecida como *Dysadehrin* ou *phospholemman* (PLM). Esta, ao se associar a bomba de Na+ K+ ATPase regula suas propriedades de transporte (Crambert et al. 2002; Mahmmoud et al. 2003). Feschenko e colaboradores mostraram que esta proteína e altamente expressa em estruturas específicas do sistema nervoso central. Utilizando cérebros de rato, mostraram que é abundante no cerebelo, em neurônios de Purkinje, e no plexo de coroide (Feschenko et al. 2003). Foi identificada na membrana de neurônios do córtex frontal de camundongos, onde foi caracterizada no contexto da síndrome de Rett (Deng et al. 2007). É uma proteína que pode estar presente em

diferentes membranas celulares, desde a membrana citoplasmática até vesículas intracitoplasmáticas (Feschenko et al. 2003; Deng et al. 2007).

Alguns trabalhos existentes na literatura já a sugeriram como marcador de prognóstico, tumores de pâncreas, pulmão, gástricos e de mama (Ino, Gotoh et al. 2002; Shimamura, Yasuda et al. 2004; Nam, Kang et al. 2006; Mitselou, Batistatou et al. 2010; Ono, Uramoto et al. 2010; Maehata, Hirahashi et al. 2011). Entretanto, nossos resultados não apontaram correlação estatisticamente significante entre a abundância desta proteína e a sobrevida câncer específica, bem como a probabilidade de desenvolvimento de metástases (ANEXOS: Figura.S23 e S24).

Nossos resultados de imunofluorescência nas linhagens celulares de câncer de mama, indicaram que em MDA-MB-231 (maior potencial metastático), PLM mostrou localização citoplasmática, mas de uma forma vesicular que não foi vista nas demais linhagens celulares (ANEXOS: Figura S21). Fato que nos chamou atenção, pois novamente esta linhagem de comportamento agressivo mostra nuances de localização diferentes quando comparadas às outras linhagens, sobretudo às luminais. Não investigamos, entretanto, se nestas linhagens há maior atividade da bomba de Na K ATPase e se isto contribuiria para a maior agressividade desta linhagem.

Nossas secções de tecido mamário acometidos por carcinoma ductal invasivo coradas por IHC para PLM, mostraram na maioria das vezes a localização citoplasmática desta (ANEXOS: Figura S22). No entanto, em C, observamos uma disposição diferente desta proteína, que apesar de mostrar localização predominantemente citoplasmática, apresenta um aspecto vesicular, com granulações. O que nos levou a questionar se haveriam semelhanças aos achados

de imunofluorescência da linhagem MDA-MB-231. Embora não investigado a fundo, esse gene teria promissores propostas de estudo.

5.4.6. ABCG1

A proteína codificada por este gene é um membro da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que estão envolvidos no transporte de várias moléculas através da membrana plasmática ou membranas de compartimentos intracelulares (Klucken et al. 2000; Jakobsson et al. 2009). Alguns estudos sugerem que ABCG1 age como transportador no efluxo de drogas resultando menor eficácia da quimioterapia empregada (Janvilisri et al. 2003).

Nossos resultados obtidos com as análises de TMA não mostraram relação significativa entre a abundância proteica de ABCG1 com a sobrevida câncer específica e a probabilidade de desenvolvimento de metástases (ANEXOS: Figuras S8 e S9). Adicionalmente, as imagens representativas dos cortes histológicos de casos constituintes dos TMAs corados por IHC para ABCG1, mostraram forte marcação citoplasmática desta proteína. Por ser uma proteína de membrana, esperaríamos encontrá-la nesta localização subcelular, ou mesmo em membranas intracelular, o que não corresponde aos nossos achados (ANEXOS: Figura S7). Nossos resultados de *western blot* utilizando o mesmo anticorpo apresentou bandas compatíveis ao tamanho esperado, mas bandas adicionais e rastros de inespecificidade também foram detectados (ANEXOS: Figura S5). Estes resultados nos leva a pensar que o anticorpo anti- ABCG1 usado nos experimentos com TMA não é tão específico o que nos motivou a descontinuá-lo de nossa abordagem.

5.4.7. ARPC3

A proteína codificada por este gene faz parte de um grande complexo multi-proteico, que tem implicações ramificação e extensão dos filamentos de actina constituintes do citoesqueleto (Machesky et al. 1997). O fato do gene ter se mostrado diferencialmente expresso no microarranjo de DNA, juntamente com CIP4 nos chamou a atenção, uma vez que ambos os produtos proteicos supostamente estariam envolvidos em mudanças no metabolismo do citoesqueleto sofrido por células tumorais durante a disseminação de metástases. No entanto, tivemos algumas dificuldades na utilização do anticorpo contra ARPC3 (p21-Arc como também é conhecida). Entre elas, podemos citar a dificuldade de obtenção de resultados preliminares de *western blot* e imunofluorescência realizados com as linhagens celulares de câncer de mama. Estes dados foram considerados uma etapa fundamental na validação do anticorpo para os ensaios de TMA que se seguiram. Ainda sim, insistimos com este gene para os ensaios de TMA. As curvas de Kaplan-Meier usando valores e imunomarcação para ARPC3, surpreendentemente mostraram significância estatística. As curvas de sobrevida e incidência de metástases mostraram relação com a abundância de ARPC3, embora com pontos de corte muito baixos (Figuras. 16 e 17). Por ser interessantes, julgamos válido incluir esses resultados no corpo da tese, mas devemos admitir que careceram de validação adequada. O que limita as conclusões que poderíamos tirar a respeito de sua contribuição no processo metastático. Dessa forma, descontinuamos o estudo desta proteína.

5.5. Análise funcional de CIP4

As proteínas F-BAR (CIP4, Toca1 e FPB17) têm sido correlacionadas a estabilização de curvaturas na membrana, implicando em processos celulares como invaginação celular mediada por clatrinas, filopodia, lamelipodia e formação de podossomos (Takano et al. 2008; Bu et al. 2009; Bu et al. 2010). Porém, apenas recentemente foi demonstrado o envolvimento de proteínas F-BAR na formação do invadopodia em células tumorais de mama (Pichot et al. 2010). No trabalho de Pichot e colaboradores, foi demonstrado que CIP4 localiza-se em invadopodias (Pichot et al. 2010). Posteriormente, em 2011, o grupo do Prof. Andrew Craig da Universidade Queen's (Kingston, ON, Canadá) publicou outro importante trabalho correlacionando CIP4 ao fenótipo invasivo. Neste trabalho foi demonstrado que CIP4 é substrato de Src e transloca-se para o invadopodia quando fosforilada (Hu et al. 2011).

As áreas de invadopodia digerem ativamente a matriz extracelular (ECM, sigla do Inglês) (Pichot et al. 2010; Hu et al. 2011; Chander et al. 2012). Pichot e colaboradores sugeriram que CIP4 estariam atuando como modulador positivo da formação de invadopodia, uma vez que, seu silenciamento transiente diminui o número de invadopodias por células. Além disso, demonstraram que esta depleção de CIP4 diminui as taxas de migração e invasão celular (Pichot et al. 2010).

Simultaneamente a publicação do trabalho de Pichot et. al., foram obtidos neste trabalho dados de PCR em tempo real e *Western blot* concordante, demonstrando que a expressão do gene CIP4 encontra-se aumentada na linhagem mesenquimal/metastática MDA-MB-231. Obtivemos também dados de imunofluorescência demonstrando a presença de *foci* de CIP4 na membrana

citoplasmática adjacentes às fibras de stress de F-Actina. Como estes resultados foram apresentados no trabalho de Pichot et al e perderam o ineditismo, seguimos explorando aspectos mecanísticos de CIP4 ainda não elucidados, a investigação de seu potencial metastático *in vivo*, bem como a sua quantificação em amostras clínicas de pacientes portadores de carcinoma de mama utilizando TMAs.

Para os ensaios em cultura, utilizamos um sistema de silenciamento indutível por Dox para o silenciamento de CIP4, diferente do empregado anteriormente por Pichot. Este sistema foi eficaz para a depleção de CIP4 na linhagem MDA-MB-231 tanto em cultura (Figura. 24), como *in vivo* (Figura 30). Realizamos ensaios de *wound healing* (cicatrização), migração e invasão em *transwell* e ensaios de invasão empregando cultura 3D. Nossos resultados indicam que a depleção de CIP4 reduziu as taxas de migração e invasão em *transwell*, corroborando com os achados Pichot e colaboradores. O ensaio de invasão em 3D recapitula o microambiente tumoral, uma vez que as junções célula-célula e a total imersão na matriz extracelular (matrigel neste caso) simulam com mais proximidade o que aconteceria *in vivo*. Por isso, fornece medidas de invasão mais robustos. Nossos resultados em invasão 3D corroboram com os ensaios em *Transwell*, indicando que com a depleção de CIP4 o potencial invasivo das células reduz-se em aproximadamente 50% (Figura 28).

A sinalização anormal de EGF tem sido relacionado a vários tipos de câncer, sobretudo nos carcinomas mamários (Yao et al. 1988; Yarden 2001; Canil et al. 2005; Chang et al. 2011). Estas anormalidades podem ser devido a aumento da expressão do receptor de EGF (EGFR) (Rusch et al. 1997), a amplificação do gene (Hirsch et al. 2008) ou mutações com ganho de função (Lynch et al. 2004). Com o intuito de verificar como a sinalização de EGFR é afetada por CIP4, realizamos o tratamento com EGF em células MDA-MB-231 com e sem depleção de CIP4 e

investigamos seus efeitos após exposição ao fator de crescimento (Figura 25). Além do receptor EGFR e sua forma fosforilada, avaliamos também a abundância de dois importantes efetores da transdução de sinais a jusante de EGFR: MAPK-p38 e Akt. A depleção de CIP4 aparentemente aumentou a concentração de EGFR. Também verificamos que a abundância relativa de EGFR é maior nas células que estavam com CIP4 silenciada no momento do tratamento com EGF (Figura 25).

Nossos resultados indicam ainda que CIP4 está envolvida na ativação de MAPK-p38. Malet-Engra e colaboradores observaram na linhagem JVM3, derivada de Leucemia Linfocítica Crônica (LCC), que a depleção de CIP4 prejudica a ativação de PAK1 e MAPK-p38 (Malet-Engra et al. 2013), resultando na diminuição da formação de lamellipodia e inibição da migração direcionada por quimiotaxia (Malet-Engra et al. 2013), corroborando com nossos resultados.

De maneira concordante à diminuição da ativação de MAPK-p38, notamos que durante o silenciamento de CIP4, houve redução da expressão de MMP2 na linhagem MDA-MB-231. Essa metaloproteinase, também conhecida como gelatinase (Nagase et al. 1991), é secretada exercendo importante papel na degradação de matriz extracelular tanto em processos fisiológicos normais (Irwin et al. 1996), quanto na disseminação de metástases (Gupta et al. 2007) (Egeblad and Werb 2002). Alguns trabalhos demonstraram que MAPK-p38 controla a expressão MMP2 (Kim et al. 2004; Zhong et al. 2006; Kumar et al. 2010). De maneira concordante, nossos resultados indicam que nas células em que CIP4 foi silenciada, houve diminuição na ativação de MAPK-p38 (Figura 25), com a concomitante redução da expressão de MMP2 (Figura 26). O que nos leva a inferir que CIP4 é um modulador positivo da expressão de MMP2. Além disso, alguns trabalhos sugerem que MMP2 é parte da assinatura de EMT (Yokoyama et al. 2003; Kasai et al. 2005; Taki et al. 2006).

Desse modo, também podemos sugerir que CIP4 tem influência no processo EMT, corroborando outros indícios apontados na literatura (Bai et al. 2012; Zhang et al. 2013).

Em 2012, foi publicado um trabalho que sugere que Toca1 (parálogo de CIP4) é um indutor positivo na promoção de migração e invasão de tumores de mama in vitro, bem como na geração de metástases espontâneas nos pulmões (Chander et al. 2012). Os efeitos da depleção de CIP4 em tumores *in vivo* e na geração de metástases foram sugeridos pela primeira vez no início deste ano. Koshkina e colaboradores, sugeriram que o silenciamento de CIP4 com shRNAs impede a progressão de osteossarcomas e sua disseminação metastática (Koshkina et al. 2013). Nosso trabalho, utilizou o modelo de camundongos $Rag^{-/-}$ $\gamma c^{-/-}$ que receberam células MDA-MB-231 transduzidas com os vetores lentivirais carreando os shRNA contra CIP4 bem como os respectivos controles. Nossos resultados indicam que o silenciamento de CIP4 reduziu em aproximadamente 50% o número de metástases pulmonares (Figura 32). Nossos experimentos *in vivo* com as células inoculadas pela veia caudal indicam que CIP4 é necessário apenas em etapas iniciais do processo metastático, sendo indiferente nas etapas finais de extravasão e colonização metastática (Figura 4). Como o invadopodia está envolvido com a migração e invasão celular, nossos resultados reforçam o conceito de que CIP4 é uma proteína adaptadora fundamental na gênese e maturação do invadopodia. Ao recrutar Cdc42 ativa e N-Wasp, CIP4 parece desencadear um processo crucial para a formação e maturação do invadopodia. Outras proteínas F-BAR como TOCA-1 e FPB17 possuem os mesmos domínios proteicos e aparentemente podem desempenhar o mesmo papel. Quando CIP4 é silenciada há redução de aproximadamente 50% de redução na capacidade migratória, invasiva e na geração

de metástases. Possivelmente, as outras proteínas F-BAR estão sobrepondo à função de CIP4, o que gera uma interessante perspectiva de estudo envolvendo o silenciamento simultâneo ou combinado de todas as proteínas F-BAR.

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que CIP4 é um potente modulador positivo na formação de metástases, apresentando expressão aumentada tanto em pacientes com pior prognóstico para desenvolver metástases, como em linhagens celulares metastáticas. Os ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo* indicaram que a depleção de CIP4 diminui o potencial metastático da linhagem tumoral MDA-MD-231. O silenciamento de CIP4 não afetou a capacidade de formação de tumores primários na mama de animais inoculados com células MDA-MB-231. Ensaios adicionais ainda são necessários para expandir a compreensão acerca da função de CIP4 no microambiente tumoral, incluindo a detecção de formas fosforiladas da proteína. Entretanto, seu potencial como marcador de prognóstico e alvo terapêutico pode ser sugerido pelos resultados aqui apresentados.

6. CONCLUSÕES

- Os 8 candidatos selecionados para avaliação como marcadores de prognóstico do carcinoma de mama a partir de experimentos de microarranjos de DNA apresentaram resultados discrepantes quando avaliados em um conjunto independente de amostras utilizando TMAs.
- Três candidatos apresentaram potencial como marcadores de prognóstico nos ensaios de TMA com amostras de carcinoma de mama invasivo. A expressão reduzida de ARPC3, PPIL1 ou aumentada de CIP4 mostraram-se associadas significativamente a uma menor sobrevida câncer específica. Adicionalmente, a expressão reduzida de ARPC3 ou aumentada de CIP4 mostraram-se associadas significativamente a uma maior probabilidade de desenvolvimento de metástases após a remoção cirúrgica do tumor.
- Para ARPC3 e CIP4, observamos uma relação inversa ao analisar separadamente as amostras de tumores com subtipo luminal A, onde a expressão aumentada (ARPC3) ou reduzida (CIP4) da proteína, apresentou-se associada à um pior prognóstico. Este resultado sugere que a abundância relativa dessas proteínas pode ter significados distintos dependendo do contexto de sinalização molecular das células tumorais.
- A expressão de CIP4 encontra-se aumentada na linhagem mesenquimal/metastática MDA-MB-231, se acumulando focalmente na membrana citoplasmática.
- Nossos resultados indicam que CIP4 modula a fosforilação de MAPK-p38 e é um modulador positivo da expressão de MMP2. Estes dados apontam que CIP4 deve ter um papel importante nas vias de sinalização da EMT durante a disseminação metastática no câncer de mama.

- O silenciamento estável e regulado de CIP4 na linhagem MDA-MB-231 resultou em uma redução de aproximadamente 50% da capacidade migratória, invasiva e de geração de metástases.
- Ensaios utilizando animais inoculados com células MDA-MB-231 com CIP4 silenciado revelaram que a proteína CIP4 não é essencial para o estabelecimento/crescimento dos tumores primários mas é um potente modulador positivo de eventos iniciais da disseminação de metástases *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcon-Vargas, D. and Z. e. Ronai (2002). "SUMO in cancer-wrestlers wanted." Cancer biology & therapy **1**(3): 237-242.

Alberts, B. A., Johnson; Julian, Lewis; Martin, Raff; Keith, Roberts; Peter, Walter. (2007). Molecular Biology of the Cell. Molecular Biology of the Cell, Garland Science.

Alvarenga, A. W., C. M. Coutinho-Camillo, et al. (2013). "A Comparison between Manual and Automated Evaluations of Tissue Microarray Patterns of Protein Expression." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **61**(4): 272-282.

Anastasiadis, P. Z. and A. B. Reynolds (2001). "Regulation of Rho GTPases by p120-catenin." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 604-610.

Anders, C. and L. A. Carey (2008). "Understanding and treating triple-negative breast cancer." Oncology (Williston Park) **22**(11): 1233-1239; discussion 1239-1240, 1243.

Anderson, L. and J. Seilhamer (1997). "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver." Electrophoresis **18**(3-4): 533-537.

Anderson, N. L. and N. G. Anderson (1998). "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words." Electrophoresis **19**(11): 1853-1861.

Apter, D. and R. VIHKO (1983). "Early Menarche, a Risk Factor for Breast Cancer, Indicates Early Onset of Ovulatory Cycles*." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **57**(1): 82-86.

Arreygue-Garcia, N. A., A. Daneri-Navarro, et al. (2008). "Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions." BMC Cancer **8**(1): 16.

Arreygue-Garcia, N. A., A. Daneri-Navarro, et al. (2008). "Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions." BMC Cancer **8**: 16.

Aspenström, P. (1997). "A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton." Current Biology **7**(7): 479-487.

Aspenström, P., Å. Fransson, et al. (2006). "Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton." Trends in biochemical sciences **31**(12): 670-679.

Bader, B. L., H. Rayburn, et al. (1998). "Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all αv integrins." Cell **95**(4): 507-519.

Badve, S., D. J. Dabbs, et al. (2011). "Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists." Mod Pathol **24**(2): 157-167.

Bai, S., R. Zeng, et al. (2012). "Cdc42-interacting protein-4 promotes TGF-B1-induced epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix deposition in renal proximal tubular epithelial cells." Int J Biol Sci **8**(6): 859-869.

Barsky, S. H. and N. J. Karlin (2005). "Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression." Journal of mammary gland biology and neoplasia **10**(3): 249-260.

Bartel, D. P. and C.-Z. Chen (2004). "Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs." Nature Reviews Genetics **5**(5): 396-400.

Battaglia, F., G. Scambia, et al. (1988). "Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptors and axillary lymph node involvement." European Journal of Cancer and Clinical Oncology **24**(11): 1685-1690.

Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-729.

Belasco, J. G. and G. Brawerman (1993). Control of messenger RNA stability, Access Online via Elsevier.

Bergamaschi, A., G. O. Hjortland, et al. (2009). "Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models." Mol Oncol **3**(5-6): 469-482.

Berglund, L., E. Bjorling, et al. (2008). "A genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies." Mol Cell Proteomics **7**(10): 2019-2027.

Bettstetter, M., M. Woenckhaus, et al. (2005). "Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer." The Journal of pathology **205**(5): 606-614.

Bloom, H. and W. Richardson (1957). "Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." British Journal of Cancer **11**(3): 359.

Bochtler, M., L. Ditzel, et al. (1999). "The proteasome." Annual review of biophysics and biomolecular structure **28**(1): 295-317.

Bogdanova, N., S. Helbig, et al. (2013). "Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle." Hereditary cancer in clinical practice **11**(1): 12.

Borrirukwanit, K., M. A. Lafleur, et al. (2007). "The type I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP2 activation is repressed by alphaVbeta3 integrin in human breast cancer cells." Matrix Biol **26**(4): 291-305.

Boyd, J. (2014). "Genetic predisposition to breast cancer: The next chapters." Cancer.

Boyd, N. F., G. S. Dite, et al. (2002). "Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer." New England Journal of Medicine **347**(12): 886-894.

Brase, J. C., M. Schmidt, et al. (2010). "ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction." Clinical Cancer Research **16**(8): 2391-2401.

Bu, W., A. M. Chou, et al. (2009). "The Toca-1-N-WASP complex links filopodial formation to endocytosis." J Biol Chem **284**(17): 11622-11636.

Bu, W., K. B. Lim, et al. (2010). "Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis." PLoS One **5**(8): e12153.

Buccione, R., G. Caldieri, et al. (2009). "Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix." Cancer and Metastasis Reviews **28**(1-2): 137-149.

Bueno-de-Mesquita, J. M., S. C. Linn, et al. (2009). "Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer." Breast Cancer Res Treat **117**(3): 483-495.

Cailleau, R., M. Olivé, et al. (1978). "Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization." In vitro **14**(11): 911-915.

Caldarella, A., E. Crocetti, et al. (2011). "Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis." Pathology & Oncology Research **17**(3): 753-758.

Camp, R. L., L. A. Charette, et al. (2000). "Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma." Laboratory Investigation **80**(12): 1943-1949.

Camp, R. L., M. Dolled-Filhart, et al. (2004). "X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization." Clin Cancer Res **10**(21): 7252-7259.

Camp, R. L., V. Neumeister, et al. (2008). "A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers." Journal of clinical oncology **26**(34): 5630-5637.

Canil, C., M. Moore, et al. (2005). "Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group." Journal of clinical oncology **23**(3): 455-460.

Canon, J., R. Bryant, et al. (2012). "RANKL inhibition combined with tamoxifen treatment increases anti-tumor efficacy and prevents tumor-induced bone destruction in an estrogen receptor-positive breast cancer bone metastasis model." Breast cancer research and treatment **135**(3): 771-780.

Cardoso, F., J. Bischoff, et al. (2013). "A review of the treatment of endocrine responsive metastatic breast cancer in postmenopausal women." Cancer treatment reviews **39**(5): 457-465.

Carnegie, G. K., C. K. Means, et al. (2009). "A-kinase anchoring proteins: From protein complexes to physiology and disease." IUBMB life **61**(4): 394-406.

Chander, H., P. Truesdell, et al. (2012). "Transducer of Cdc42-dependent actin assembly promotes breast cancer invasion and metastasis." Oncogene.

Chang, H. H., J. M. Dreyfuss, et al. (2011). "A transcriptional network signature characterizes lung cancer subtypes." Cancer **117**(2): 353-360.

Charpentier, M. and S. Martin (2013). "Interplay of Stem Cell Characteristics, EMT, and Microtentacles in Circulating Breast Tumor Cells." Cancers **5**(4): 1545-1565.

Cheang, M. C., S. K. Chia, et al. (2009). "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." J Natl Cancer Inst **101**(10): 736-750.

Chen, L. S., C. F. Lo, et al. (1997). "Characterization of the human and rat phospholemman (PLM) cDNAs and localization of the human PLM gene to chromosome 19q13.1." Genomics **41**(3): 435-443.

Chen, Q., C. D. Manning, et al. (2008). "CNTO 95, a fully human anti alphav integrin antibody, inhibits cell signaling, migration, invasion, and spontaneous metastasis of human breast cancer cells." Clin Exp Metastasis **25**(2): 139-148.

CHEN, W. T. and J. Y. WANG (1999). "Specialized Surface Protrusions of Invasive Cells, Invadopodia and Lamellipodia, Have Differential MT1-MMP, MMP-2, and TIMP-2 Localization." Annals of the New York Academy of Sciences **878**(1): 361-371.

Coleman, R. and R. Rubens (1987). "The clinical course of bone metastases from breast cancer." British Journal of Cancer **55**(1): 61.

Crambert, G., M. Füzesi, et al. (2002). "Phospholemman (FXYD1) associates with Na, K-ATPase and regulates its transport properties." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(17): 11476-11481.

Cregger, M., A. J. Berger, et al. (2006). "Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression." Archives of pathology & laboratory medicine **130**(7): 1026-1030.

Curtis, C., S. P. Shah, et al. (2012). "The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups." Nature **486**(7403): 346-352.

David, R. (2013). "Post-translational modifications: Dishing up the right protein to the proteasome." Nature Reviews Molecular Cell Biology **14**(3): 130-130.

Denadai, M. V., L. S. Viana, et al. (2013). "Expression of integrin genes and proteins in progression and dissemination of colorectal adenocarcinoma." BMC Clin Pathol **13**(1): 16.

Denadai, R. and L. R. M. Souto (2013). "Comments on the giant basal cell carcinoma." Anais Brasileiros De Dermatologia **88**(2): 316-316.

Deng, V., V. Matagne, et al. (2007). "FXYD1 is an MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and Mecp2-null mice." Human molecular genetics **16**(6): 640-650.

Deryugina, E. I., B. Ratnikov, et al. (2001). "MT1-MMP initiates activation of pro-MMP2 and integrin αvβ3 promotes maturation of MMP2 in breast carcinoma cells." Experimental cell research **263**(2): 209-223.

Duffy, M. J. and C. Duggan (2004). "The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer." Clin Biochem **37**(7): 541-548.

Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nature reviews cancer **2**(3): 161-174.

Ein-Dor, L., I. Kela, et al. (2005). "Outcome signature genes in breast cancer: is there a unique set?" Bioinformatics **21**(2): 171-178.

El Roz, A., J. M. Bard, et al. (2012). "LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis." Anticancer Res **32**(7): 3007-3013.

Ellis, I. O. (2010). "Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology." Modern Pathology **23**: S1-S7.

Elston, C. and I. Ellis (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." Histopathology **19**(5): 403-410.

Emde, A., W. J. Köstler, et al. (2012). "Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer." Critical reviews in oncology/hematology **84**: e49-e57.

Esteva, F. J. and G. N. Hortobagyi (2004). "Prognostic molecular markers in early breast cancer." Breast cancer research **6**(3): 109-118.

Ferlay, J., H. R. Shin, et al. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.

Feschenko, M. S., C. Donnet, et al. (2003). "Phospholemman, a single-span membrane protein, is an accessory protein of Na, K-ATPase in cerebellum and choroid plexus." The Journal of neuroscience **23**(6): 2161-2169.

Feschenko, M. S., C. Donnet, et al. (2003). "Phospholemman, a single-span membrane protein, is an accessory protein of Na,K-ATPase in cerebellum and choroid plexus." J Neurosci **23**(6): 2161-2169.

Fisher, B., M. Bauer, et al. (1985). "Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer." New England Journal of Medicine **312**(11): 665-673.

Franzin, C. M., X. M. Gong, et al. (2007). "Structures of the FXYD regulatory proteins in lipid micelles and membranes." J Bioenerg Biomembr **39**(5-6): 379-383.

Frost, A., R. Perera, et al. (2008). "Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains." Cell **132**(5): 807-817.

Futcher, B., G. Latter, et al. (1999). "A sampling of the yeast proteome." Molecular and cellular biology **19**(11): 7357-7368.

Gligorijevic, B., J. Wyckoff, et al. (2012). "N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors." Journal of cell science **125**(3): 724-734.

Golub, T. R., D. K. Slonim, et al. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." Science **286**(5439): 531-537.

Goncalves, A., B. Esterni, et al. (2006). "Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy." Oncogene **25**(7): 981-989.

Goyal, A., R. G. Newcombe, et al. (2008). "Morbidity in breast cancer patients with sentinel node metastases undergoing delayed axillary lymph node dissection (ALND) compared with immediate ALND." Annals of surgical oncology **15**(1): 262-267.

Grabrick, D. M., L. C. Hartmann, et al. (2000). "Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer." JAMA **284**(14): 1791-1798.

Graham, T. A., C. Weaver, et al. (2000). "Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex." Cell **103**(6): 885-896.

Greenbaum, D., C. Colangelo, et al. (2003). "Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale." Genome Biol **4**(9): 117.

Groh, V., A. Steinle, et al. (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells." Science **279**(5357): 1737-1740.

Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-738.

Grosheva, I., M. Shtutman, et al. (2001). "p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion." J Cell Sci **114**(Pt 4): 695-707.

Gupta, G. P., D. X. Nguyen, et al. (2007). "Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis." Nature **446**(7137): 765-770.

Gygi, S. P., Y. Rochon, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Molecular and cellular biology **19**(3): 1720-1730.

Ha, G., A. Roth, et al. (2012). "Integrative analysis of genome-wide loss of heterozygosity and monoallelic expression at nucleotide resolution reveals disrupted pathways in triple-negative breast cancer." Genome research **22**(10): 1995-2007.

Habashy, H. O., D. G. Powe, et al. (2012). "A review of the biological and clinical characteristics of luminal-like oestrogen receptor-positive breast cancer." Histopathology **60**(6): 854-863.

Habashy, H. O., D. G. Powe, et al. (2010). "The prognostic significance of PELP1 expression in invasive breast cancer with emphasis on the ER-positive luminal-like subtype." Breast Cancer Res Treat **120**(3): 603-612.

Haffty, B. G., Q. Yang, et al. (2006). "Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer." J Clin Oncol **24**(36): 5652-5657.

Hajra, K. M., D. Y. Chen, et al. (2002). "The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer." Cancer Res **62**(6): 1613-1618.

Hall, J. M., M. K. Lee, et al. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science **250**(4988): 1684-1689.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hassiotou, F. and D. Geddes (2013). "Anatomy of the human mammary gland: current status of knowledge." Clinical anatomy **26**(1): 29-48.

Haudek, K. C., K. J. Spronk, et al. (2010). "Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1800**(2): 181-189.

Hayes, D. (1995). Atlas of Breast Cancer.

Hegele, A., A. Kamburov, et al. (2012). "Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome." Molecular cell **45**(4): 567-580.

Helfrich, M. H., S. A. Nesbitt, et al. (1992). "Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin." J Bone Miner Res **7**(3): 335-343.

Helmrich, S. P., S. SHAPIRO, et al. (1983). "Risk factors for breast cancer." American journal of epidemiology **117**(1): 35-45.

Helpap, B. (1989). "Nucleolar grading of breast cancer." Virchows Archiv A **415**(6): 501-508.

Hirsch, F. R., R. S. Herbst, et al. (2008). "Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non–small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy." Journal of clinical oncology **26**(20): 3351-3357.

Hollestelle, A., J. H. Nagel, et al. (2010). "Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **121**(1): 53-64.

Howat, J., D. Barnes, et al. (1983). "The association of cytosol oestrogen and progesterone receptors with histological features of breast cancer and early recurrence of disease." British Journal of Cancer **47**(5): 629.

Hu, J., A. Mukhopadhyay, et al. (2011). "Transducer of Cdc42-dependent actin assembly promotes epidermal growth factor-induced cell motility and invasiveness." J Biol Chem **286**(3): 2261-2272.

Hu, J., A. Mukhopadhyay, et al. (2011). "Cdc42-interacting protein 4 is a Src substrate that regulates invadopodia and invasiveness of breast tumors by promoting MT1-MMP endocytosis." Journal of cell science **124**(10): 1739-1751.

Hu, J., A. Mukhopadhyay, et al. (2011). "Cdc42-interacting protein 4 is a Src substrate that regulates invadopodia and invasiveness of breast tumors by promoting MT1-MMP endocytosis." J Cell Sci **124**(Pt 10): 1739-1751.

Hu, J., F. Troglio, et al. (2009). "F-BAR-containing adaptor CIP4 localizes to early endosomes and regulates Epidermal Growth Factor Receptor trafficking and downregulation." Cellular signalling **21**(11): 1686-1697.

Hui, R., A. L. Cornish, et al. (1996). "Cyclin D1 and estrogen receptor messenger RNA levels are positively correlated in primary breast cancer." Clinical Cancer Research **2**(6): 923-928.

Hunter, T. (1998). "Prolyl isomerases and nuclear function." Cell **92**(2): 141-143.

INCA, M. d. S. (2012). Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2012. I. N. d. Câncer. Rio de Janeiro, RJ, Ministério da Saúde.

Ino, Y., M. Gotoh, et al. (2002). "Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 365-370.

Irvin, W. J., Jr. and L. A. Carey (2008). "What is triple-negative breast cancer?" Eur J Cancer **44**(18): 2799-2805.

Irwin, J., D. Kirk, et al. (1996). "Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle." Journal of Clinical Investigation **97**(2): 438.

Ithimakin, S., K. C. Day, et al. (2013). "HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab." Cancer Res **73**(5): 1635-1646.

Itoh, T., K. S. Erdmann, et al. (2005). "Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins." Developmental cell **9**(6): 791-804.

Jakobsson, T., N. Venteclef, et al. (2009). "GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus." Molecular cell **34**(4): 510-518.

Jakobsson, T., N. Venteclef, et al. (2009). "GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus." Mol Cell **34**(4): 510-518.

Janvilisri, T., H. Venter, et al. (2003). "Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in Lactococcus lactis." J Biol Chem **278**(23): 20645-20651.

Jeanes, A., C. J. Gottardi, et al. (2008). "Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?" Oncogene **27**(55): 6920-6929.

Jiang, G., G. Giannone, et al. (2003). "Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin." Nature **424**(6946): 334-337.

Jurica, M. S. and M. J. Moore (2003). "Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins." Molecular cell **12**(1): 5-14.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." The Journal of clinical investigation **119**(6): 1420.

Kasai, H., J. T. Allen, et al. (2005). "TGF-β1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)." Respiratory research **6**(1): 56.

Kelsey, J. L., M. D. Gammon, et al. (1993). "Reproductive factors and breast cancer." Epidemiologic reviews **15**(1): 36.

Kim, E.-S., M.-S. Kim, et al. (2004). "TGF-β-induced upregulation of MMP2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells." International journal of oncology **25**(5): 1375-1382.

Kim, R., M. Emi, et al. (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." Immunology **121**(1): 1-14.

Kirschner, M. (1999). "Intracellular proteolysis." Trends in cell biology **9**(12): M42-M45.

Klucken, J., C. Buchler, et al. (2000). "ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 817-822.

Kononen, J., L. Bubendorf, et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nature medicine **4**(7): 844-847.

Koshkina, N. V., G. Yang, et al. (2013). "Inhibition of Cdc42-interacting protein 4 (CIP4) impairs osteosarcoma tumor progression." Curr Cancer Drug Targets **13**(1): 48-56.

Krieghoff, E., J. Behrens, et al. (2006). "Nucleo-cytoplasmic distribution of β-catenin is regulated by retention." Journal of cell science **119**(7): 1453-1463.

Krueger, K. E. and S. Srivastava (2006). "Posttranslational Protein Modifications Current Implications for Cancer Detection, Prevention, and Therapeutics." Molecular & Cellular Proteomics **5**(10): 1799-1810.

Kultgen, P. L., S. K. Byrd, et al. (2002). "Characterization of an A-kinase anchoring protein in human ciliary axonemes." Mol Biol Cell **13**(12): 4156-4166.

Kumar, B., S. Koul, et al. (2010). "p38 Mitogen-Activated Protein Kinase–Driven MAPKAPK2 Regulates Invasion of Bladder Cancer by Modulation of MMP2 and MMP-9 Activity." Cancer research **70**(2): 832-841.

Lacroix, M. and G. Leclercq (2004). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update." Breast Cancer Res Treat **83**(3): 249-289.

Lakhani, S., Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. (2012). "WHO Classification of tumours of the breast. 4th." World Health Organization Classification of Tumours, v.4 **4th**

(Lyon: IARC): p.8-9.

Lane, D., N. Goncharenko-Khaider, et al. "Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through alphavbeta5 integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation." Oncogene **29**(24): 3519-3531.

Le Devedec, S. E., W. van Roosmalen, et al. (2009). "An improved model to study tumor cell autonomous metastasis programs using MTLn3 cells and the Rag2(-/-) gammac (-/-) mouse." Clin Exp Metastasis **26**(7): 673-684.

Lee, Y. K., S. Y. Lee, et al. (2012). "Dysadherin expression promotes the motility and survival of human breast cancer cells by AKT activation." Cancer Sci **103**(7): 1280-1289.

Lehmann, B. D., J. A. Bauer, et al. (2011). "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies." J Clin Invest **121**(7): 2750-2767.

Linder, S. (2007). "The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation." Trends in cell biology **17**(3): 107-117.

Lipshitz, H. D. and C. A. Smibert (2000). "Mechanisms of RNA localization and translational regulation." Current opinion in genetics & development **10**(5): 476-488.

Liu, H., D. C. Radisky, et al. (2012). "MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of alphav and beta3 integrin subunits." Nat Cell Biol **14**(6): 567-574.

Liu, X. H., A. Kirschenbaum, et al. (2002). "Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1α stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line." Journal of Biological Chemistry **277**(51): 50081-50086.

Lo, S. S., Y. J. Lee, et al. (2004). "The increase of MICA gene A9 allele associated with gastric cancer and less schirrous change." Br J Cancer **90**(9): 1809-1813.

Lu, J. G., Y. N. Sun, et al. (2009). "Role of the alpha v-integrin subunit in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas: a clinical and in vitro investigation." Eur Arch Otorhinolaryngol **266**(1): 89-96.

Ludwig, J. A. and J. N. Weinstein (2005). "Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection." Nature reviews cancer **5**(11): 845-856.

Lux, M. P., P. A. Fasching, et al. (2006). "Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives." Journal of Molecular Medicine **84**(1): 16-28.

Lynch, T. J., D. W. Bell, et al. (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–small-cell lung cancer to gefitinib." New England Journal of Medicine **350**(21): 2129-2139.

Machado, F. A. and B. S. Denadai (2013). "Prediction of aerobic power (VO(2)max) of children and adolescents during an incremental treadmill test." Motriz-Revista De Educacao Fisica **19**(1): 126-132.

Machesky, L. M., E. Reeves, et al. (1997). "Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins." Biochem J **328 (Pt 1)**: 105-112.

Mader, C. C., M. Oser, et al. (2011). "An EGFR–Src–Arg–cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion." Cancer research **71**(5): 1730-1741.

Madjd, Z., I. Spendlove, et al. (2007). "Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma." Cancer Immun **7**: 17.

Maehata, Y., M. Hirahashi, et al. (2011). "Significance of dysadherin and E-cadherin expression in differentiated-type gastric carcinoma with submucosal invasion." Hum Pathol **42**(4): 558-567.

Mahmmoud, Y. A., G. Cramb, et al. (2003). "Regulation of Na, K-ATPase by PLMS, the phospholemman-like protein from shark Molecular cloning, sequence, expression, cellular distribution, and functional effects of PLMS." Journal of Biological Chemistry **278**(39): 37427-37438.

Malet-Engra, G., J. Viaud, et al. (2013). "CIP4 controls CCL19-driven cell steering and chemotaxis in chronic lymphocytic leukemia." Cancer research **73**(11): 3412-3424.

Marangoni, E., A. Vincent-Salomon, et al. (2007). "A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays." Clin Cancer Res **13**(13): 3989-3998.

Marquez, A., R. Wu, et al. (2004). "Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic In Situ: Hybridization (CISH (TM)) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy." Diagnostic Molecular Pathology **13**(1): 1-8.

Martin, A. and A. Cano (2010). "Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal." Nature cell biology **12**(10).

Mazumdar, M. and J. R. Glassman (2000). "Categorizing a prognostic variable: review of methods, code for easy implementation and applications to decision-making about cancer treatments." Statistics in medicine **19**(1): 113-132.

McPherson, K., C. Steel, et al. (2000). "ABC of breast diseases: breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics." BMJ: British Medical Journal **321**(7261): 624.

Meek, D. W. and U. Knippschild (2003). "Posttranslational modification of MDM2." Molecular cancer research **1**(14): 1017-1026.

Mei, J. Z., J. Z. Zhao, et al. (2012). "[Expression of MICA/B protein in esophageal cancer and its clinical significance]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi **34**(10): 745-747.

Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.

Miles, F. L., F. L. Pruitt, et al. (2008). "Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis." Clinical & experimental metastasis **25**(4): 305-324.

Mitselou, A., A. Batistatou, et al. (2010). "Comparison of the dysadherin and E-cadherin expression in primary lung cancer and metastatic sites." Histol Histopathol **25**(10): 1257-1267.

Monteagudo, C., M. J. Merino, et al. (1990). "Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue." Am J Pathol **136**(3): 585-592.

Nagase, H., A. Barrett, et al. (1991). "Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases." Matrix (Stuttgart, Germany). Supplement **1**: 421-424.

Nakanishi, T., S. Chumsri, et al. (2010). "Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling." Br J Cancer **102**(5): 815-826.

Nakaya, H. I., E. M. Reis, et al. (2007). Concepts on microarray design for genome and transcriptome analyses. Nucleic Acids Hybridization Modern Applications, Springer**:** 265-307.

Nam, J. S., M. J. Kang, et al. (2006). "Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates the prometastatic effect of dysadherin in human breast cancer cells." Cancer Res **66**(14): 7176-7184.

Ono, K., H. Uramoto, et al. (2010). "Expression of dysadherin and cytokeratin as prognostic indicators of disease-free survival in patients with stage I NSCLC." Anticancer Res **30**(9): 3273-3278.

Osório, C. A. B. d. T. (2013). IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT, PI3K E PROCESSO EMT PARA RISCO DE PROGRESSÃO DE CARCINOMA DUCTAL IN SITU DE MAMA. Fundação Antônio Prudente. São Paulo, Fundação Antônio Prudente - Hospital AC Camargo. **PhD**.

Page, D. L., R. A. Jensen, et al. (1998). Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. Prognostic variables in node-negative and node-positive breast cancer, Springer**:** 3-16.

Paik, S., S. Shak, et al. (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." New England Journal of Medicine **351**(27): 2817-2826.

Papin, C., L. A. van Grunsven, et al. (2002). "Dynamic regulation of Brachyury expression in the amphibian embryo by XSIP1." Mech Dev **111**(1-2): 37-46.

Pegram, M. D., G. Pauletti, et al. (1998). "HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy." Breast Cancer Res Treat **52**(1-3): 65-77.

Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science **287**(5458): 1606-1609.

Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.

Piccart-Gebhart, M. J. (2006). "Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn." Eur J Cancer **42**(12): 1715-1719.

Pichot, C. S. (2010). CIP4 and Src in Promoting the Migration and Invasion of Breast Cancers. UT Graduate School of Biomedical Sciences at Houston: Dissertations and Theses. Houston, University of Texas.

Pichot, C. S., C. Arvanitis, et al. (2010). "Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp." Cancer Res **70**(21): 8347-8356.

Pierobon, M. and C. L. Frankenfeld (2013). "Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis." Breast cancer research and treatment **137**(1): 307-314.

Pike, M., B. Henderson, et al. (1981). "Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women." British Journal of Cancer **43**(1): 72.

Polakis, P. (1999). "The oncogenic activation of beta-catenin." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 15-21.

Ponten, F., K. Jirstrom, et al. (2008). "The Human Protein Atlas--a tool for pathology." Journal of Pathology **216**(4): 387-393.

Pradet-Balade, B., F. Boulmé, et al. (2001). "Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?" Trends in biochemical sciences **26**(4): 225-229.

Prat, A., J. S. Parker, et al. (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." Breast Cancer Res **12**(5): R68.

Putti, T. C., D. M. A. El-Rehim, et al. (2004). "Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis." Modern Pathology **18**(1): 26-35.

Rakha, E. A. and I. O. Ellis (2009). "Triple-negative/basal-like breast cancer: review." Pathology **41**(1): 40-47.

Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, et al. (2010). "Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade." Breast Cancer Res **12**(4): 207.

Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, et al. (2008). "Basal-like breast cancer: a critical review." J Clin Oncol **26**(15): 2568-2581.

Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, et al. (2009). "Combinatorial biomarker expression in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **120**(2): 293-308.

Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, et al. (2010). "Combinatorial biomarker expression in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **120**(2): 293-308.

Rauhala, H. E., S. Teppo, et al. (2013). "Silencing of the ARP2/3 complex disturbs pancreatic cancer cell migration." Anticancer Res **33**(1): 45-52.

Reis-Filho, J., C. Westbury, et al. (2006). "The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer." Journal of clinical pathology **59**(3): 225-231.

Richnau, N. and P. Aspenström (2001). "Rich, a rho GTPase-activating protein domain-containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1." Journal of Biological Chemistry **276**(37): 35060-35070.

Risal, P., B. H. Park, et al. (2012). "Overexpression of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 attenuates hepatocytes apoptosis and secondary necrosis following carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice." Pathol Int **62**(1): 8-15.

Rodriguez, L. G., X. Wu, et al. (2005). "Wound-healing assay." Methods in molecular biology **294**: 23-29.

Rojo, M. G., G. Bueno, et al. (2010). "Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice." Folia Histochemica et Cytobiologica **47**(3): 349-348.

Rusch, V., D. Klimstra, et al. (1997). "Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression." Clinical Cancer Research **3**(4): 515-522.

Rush, J., A. Moritz, et al. (2005). "Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells." Nature biotechnology **23**(1): 94-101.

Saengsawang, W., K. Mitok, et al. (2012). "The F-BAR protein CIP4 inhibits neurite formation by producing lamellipodial protrusions." Current Biology **22**(6): 494-501.

Saengsawang, W., K. L. Taylor, et al. (2013). "CIP4 coordinates with phospholipids and actin-associated proteins to localize to the protruding edge and produce actin ribs and veils." Journal of cell science **126**(11): 2411-2423.

Saini, S., N. Jagadish, et al. (2013). "A novel cancer testis antigen, A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) is a potential biomarker for breast cancer." PLoS One **8**(2): e57095.

Sarrió, D., S. M. Rodriguez-Pinilla, et al. (2008). "Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype." Cancer research **68**(4): 989-997.

Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." Bioessays **23**(10): 912-923.

SCHMITT, F. C. L. (2008). "Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação." Rev Bras Ginecol Obstet **30**(1): 42-47.

Schnapp, L. M., N. Hatch, et al. (1995). "The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin." J Biol Chem **270**(39): 23196-23202.

Schraml, P., J. Kononen, et al. (1999). "Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types." Clinical Cancer Research **5**(8): 1966-1975.

Sekine, Y., S. J. Demosky, et al. "High Density Lipoprotein Induces Proliferation and Migration of Human Prostate Androgen Independent Cancer Cells by an ABCA1-dependent Mechanism." Mol Cancer Res.

Sharp, J. A., V. Sung, et al. (1999). "Tumor cells are the source of osteopontin and bone sialoprotein expression in human breast cancer." Lab Invest **79**(7): 869-877.

Shimada, A., H. Niwa, et al. (2007). "Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis." Cell **129**(4): 761-772.

Shimamura, T., J. Yasuda, et al. (2004). "Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells." Cancer Res **64**(19): 6989-6995.

Siegel, R., D. Naishadham, et al. (2012). "Cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **62**(1): 10-29.

Sims, M., S. Field, et al. (2000). "Cloning and characterisation of ITGAV, the genomic sequence for human cell adhesion protein (vitronectin) receptor alpha subunit, CD51." Cytogenetic and Genome Research **89**(3-4): 268-271.

Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz, et al. (2011). TNM classification of malignant tumours, Wiley. com.

Sonenberg, N., J. W. Hershey, et al. (2000). "Translational control of gene expression."

Sørlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(19): 10869-10874.

Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.

Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.

Sotiriou, C. and L. Pusztai (2009). "Gene-expression signatures in breast cancer." N Engl J Med **360**(8): 790-800.

Soule, H., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." Journal of the National Cancer Institute **51**(5): 1409-1416.

Soule, H. D., T. M. Maloney, et al. (1990). "Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10." Cancer research **50**(18): 6075-6086.

Sternlicht, M. D., P. Kedeshian, et al. (1997). "The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor." Clinical Cancer Research **3**(11): 1949-1958.

Stiepcich, M. M. Á. (2007). Perfil de citoqueratinas e sua relação com diferenciação e fatores clínicos morfológicos em carcinomas ductais soe de mama estudados em "Array de tecido"(Tissue Microararay - TMA). Fundação Antônio Prudente. São Paulo, Fundação Antônio Prudente - Hospital AC Camargo. **PhD Thesis**.

Streuli, C. H., N. Bailey, et al. (1991). "Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity." The Journal of Cell Biology **115**(5): 1383-1395.

Subramaniam, D. S. and C. Isaacs (2005). "Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer." Curr Treat Options Oncol **6**(2): 147-159.

Sung, V., J. T. Stubbs, 3rd, et al. (1998). "Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins." J Cell Physiol **176**(3): 482-494.

Takahashi, H., T. Nemoto, et al. (2006). "Cancer diagnosis marker extraction for soft tissue sarcomas based on gene expression profiling data by using projective adaptive resonance theory (PART) filtering method." BMC Bioinformatics **7**: 399.

Takano, K., K. Toyooka, et al. (2008). "EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization." EMBO J **27**(21): 2817-2828.

Takano, K., K. Toyooka, et al. (2008). "EFC/F-BAR proteins and the N-WASP–WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization." The EMBO journal **27**(21): 2817-2828.

Takano, K., K. Toyooka, et al. (2008). "EFC/F-BAR proteins and the N-WASP–WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization." The EMBO journal **27**(21): 2817-2828.

Taki, M., K. Verschueren, et al. (2006). "Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells." International journal of oncology **28**(2): 487-496.

Taneja, P., D. Maglic, et al. (2010). "Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance." Clin Med Insights Oncol **4**: 15-34.

Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiological reviews **84**(1): 137-167.

Teriete, P., C. M. Franzin, et al. (2007). "Structure of the Na,K-ATPase regulatory protein FXYD1 in micelles." Biochemistry **46**(23): 6774-6783.

Tew, K. D., A. Monks, et al. (1996). "Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program." Molecular pharmacology **50**(1): 149-159.

The_Human_Protein_Atlas_1 (2014). http://www.proteinatlas.org/dictionary/normal/breast/anatomy+1. Breast Anatomy. H. P. Atlas.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.

Tian, L., D. L. Nelson, et al. (2000). "Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules." Journal of Biological Chemistry **275**(11): 7854-7861.

Trendelenburg, G., M. Hummel, et al. (1996). "Molecular characterization of AKAP149, a novel A kinase anchor protein with a KH domain." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 313-319.

Tsujita, K., S. Suetsugu, et al. (2006). "Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis." The Journal of Cell Biology **172**(2): 269-279.

Turbin, D. A., S. Leung, et al. (2008). "Automated quantitative analysis of estrogen receptor expression in breast carcinoma does not differ from expert pathologist scoring: a tissue microarray study of 3,484 cases." Breast cancer research and treatment **110**(3): 417-426.

van 't Veer, L. J., H. Dai, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature **415**(6871): 530-536.

Van De Vijver, M. J., Y. D. He, et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." New England Journal of Medicine **347**(25): 1999-2009.

van de Vijver, M. J., Y. D. He, et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." N Engl J Med **347**(25): 1999-2009.

Veronesi, U., N. Cascinelli, et al. (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer." New England Journal of Medicine **347**(16): 1227-1232.

Viana, L. D., R. J. Affonso, et al. (2013). "Relationship between the Expression of the Extracellular Matrix Genes SPARC, SPP1, FN1, ITGA5 and ITGAV and Clinicopathological Parameters of Tumor Progression and Colorectal Cancer Dissemination." Oncology **84**(2): 81-91.

Viatour, P., M.-P. Merville, et al. (2005). "Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation." Trends in biochemical sciences **30**(1): 43-52.

VILELLA-ARIAS, S. A. (2013). Estudo de candidatos a biomarcadores moleculares de prognóstico em carcinoma renal de células claras. Departamento de Bioquímica. São Paulo, USP. **PhD**.

Vinci, M., S. Gowan, et al. (2012). "Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation." Bmc Biology **10**(1): 29.

Voges, D., P. Zwickl, et al. (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." Annual review of biochemistry **68**(1): 1015-1068.

Vorherr, H. (1974). The breast: morphology, physiology, and lactation, Academic Press.

Vu, T. and F. X. Claret (2012). "Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer." Frontiers in oncology **2**.

Wang, W., S. Goswami, et al. (2004). "Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors." Cancer research **64**(23): 8585-8594.

Wang, X., S. Zhang, et al. (2010). "A large intrinsically disordered region in SKIP and its disorder-order transition induced by PPIL1 binding revealed by NMR." Journal of Biological Chemistry **285**(7): 4951-4963.

Weaver, A. M. (2006). "Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion." Clinical & experimental metastasis **23**(2): 97-105.

Weigel, M. T. and M. Dowsett (2010). "Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction." Endocrine-related cancer **17**(4): R245-R262.

Weigelt, B., J. L. Peterse, et al. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nature reviews cancer **5**(8): 591-602.

Weigelt, B., J. L. Peterse, et al. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer **5**(8): 591-602.

Weinberg, R. A. (2006). The Biology of Cancer. The Biology of Cancer

G. Publishing. Maryland, USA, Garland Publishing.

Welch, M. D., A. H. DePace, et al. (1997). "The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly." J Cell Biol **138**(2): 375-384.

Wolff, A. C., M. E. Hammond, et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer." Arch Pathol Lab Med **131**(1): 18-43.

Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-792.

Wu, W.-S. (2006). "The signaling mechanism of ROS in tumor progression." Cancer and Metastasis Reviews **25**(4): 695-705.

Wyckoff, J. B., J. G. Jones, et al. (2000). "A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor." Cancer research **60**(9): 2504-2511.

Xu, J., S. Lamouille, et al. (2009). "TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition." Cell research **19**(2): 156-172.

Xu, Y.-Y., F. Yang, et al. (2013). "An image-based multi-label human protein subcellular localization predictor (iLocator) reveals protein mislocalizations in cancer tissues." Bioinformatics **29**(16): 2032-2040.

Yanagawa, M., K. Ikemot, et al. (2012). "Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype." BMC Res Notes **5**: 376.

Yang, J., S. A. Mani, et al. (2004). "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." Cell **117**(7): 927-939.

Yao, M., T. Shuin, et al. (1988). "Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer." Cancer research **48**(23): 6753-6757.

Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities." European journal of cancer **37**: 3-8.

Yokoyama, K., N. Kamata, et al. (2003). "Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas." International journal of oncology **22**(4): 891-898.

Yu, K. D., Z. Z. Shen, et al. (2009). "The immunohistochemically "ER-negative, PR-negative, HER2-negative, CK5/6-negative, and HER1-negative" subgroup is not a surrogate for the normal-like subtype in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **118**(3): 661-663.

Zellweger, T., C. Ninck, et al. (2003). "Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer." The Prostate **55**(1): 20-29.

Zha, J., S. Weiler, et al. (2000). "Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis." Science **290**(5497): 1761-1765.

Zhang, C. and M. W. Klymkowsky (2009). "Unexpected functional redundancy between Twist and Slug (Snail2) and their feedback regulation of NF-kappaB via Nodal and Cerberus." Dev Biol **331**(2): 340-349.

Zhang, J., M. Bi, et al. (2013). "Role of CIP4 in high glucose induced epithelial--mesenchymal transition of rat peritoneal mesothelial cells." Renal failure **35**(7): 989-995.

Zhong, J., M. M. Cornelsen Gencay, et al. (2006). "ERK1/2 and p38 MAP kinase control MMP-2, MT1-MMP, and TIMP action and affect cell migration: A comparison between mesothelioma and mesothelial cells." Journal of cellular physiology **207**(2): 540-552.

ANEXOS

Lista de tópicos

CIP4 – Introdução 157
PPIL1 – Introdução 158
Figura S1. *Western blot* realizado com anticorpos anti-PPIL1 nas linhagens celulares. 159
Figura S2. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-PPIL1 nas linhagens celulares 160
ITGAV – Introdução 161
Figura S3 *Western blot* realizado com anticorpos anti-ITGAV nas linhagens celulares 162
Figura S4. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-ITGAV nas linhagens celulares 163
ABCG1 – Introdução 164
Figura S5. Western blot realizado com anticorpos anti-ABCG1 nas linhagens celulares..... 165
Figura S6.Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-ABCG1 nas linhagens celulares 166
Figura S7 Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para ABCG1. 167
Figura S8 Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de ABCG1.. 168
Figura S9 Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de ABCG1..... 169
MICA – Introdução 170
Figura S10. Western blot realizado com anticorpos anti-MICA nas linhagens celulares..... 171
Figura S11 . Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-MICA nas linhagens celulares 172
Figura S12. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para MICA. 173
Figura S13. Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de MICA.. 174
Figura S14. Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de MICA..... 175
AKAP14 – Introdução 176

Figura S15. Western blot realizado com anticorpos anti-AKAP14 nas linhagens celulares 177
Figura S16. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-AKAP14 nas linhagens celulares 178
Figura S17. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para AKAP14 179
Figura S18. Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de AKAP14 180
Figura S19. Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de AKAP14 181
FXYD1 – Introdução 182
Figura S20. Western blot realizado com anticorpos anti-FXYD1 nas linhagens celulares 183
Figura S21 Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-FXYD1 nas linhagens celulares. 184
Figura S22. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para FXYD1 em amostras de câncer de mama 185
Figura S23. Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de FXYD1 186
Figura S24. Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de FXYD1 187
ARPC3 – Introdução 188

CIP4

CIP4 (Cdc42-interacting protein 4) é uma proteína adaptadora envolvida na regulação do trasndução de sinais via EGFR. (Hu et al. 2009; Pichot et al. 2010; Hu et al. 2011). CIP4 é membro de uma subfamília de proteinas que são caracterizadas pelo domínio F-BAR, (Fer/CIP4 homology-Bin/Amphiphysin/Rvs) (Aspenström 1997; Aspenström et al. 2006). Este domínio se liga a vários tipos de Fosfatidil-Inositol (PI), incluindo os segundos mensageiros de PI (4,5) P2, PI (3) P, e PIP3 (Itoh et al. 2005; Tsujita et al. 2006; Hu et al. 2009; Saengsawang et al. 2013). Uma das funções descritas para esse domínio é reconhecer, através da formação de dímeros, curvaturas de membranas (Shimada et al. 2007; Frost et al. 2008). Além do domínio F-BAR, que localiza-se na porção N-Terminal, CIP4 possui 2 domínios adicionais: i) *Homology Region*-1 (HR1) e ii) *Src homology-3* (SH3), localizado na porção C-terminal. Enquanto $Cdc42^{GTP}$ é o ligante exclusivo do domínio HR1 de CIP4 (Aspenström 1997), o domínio SH3 interage com um conjunto diverso de proteínas, incluindo os factores que promovem a nucleação de actina (WASP, N-WASP, WAVE), forminas (DAAM-1), Dynamin, e proteína *Cdc42/Rac GTPase-activating* (RICH-1). (Tian et al. 2000; Richnau and Aspenström 2001; Itoh et al. 2005; Aspenström et al. 2006; Takano et al. 2008).

A internalização de MT1-MMP é promovida por CIP4, que tem sua função inibida por fosforilação mediada por Src (Hu et al. 2011). Outro estudo propõe que CIP4 promove a formação de e quimiotaxia de células de leucemia linfocítica crônica (LLC) (Malet-Engra et al. 2013).

PPIL1

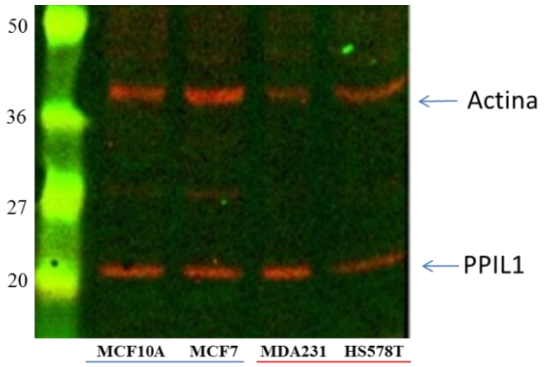
Este gene é um membro da família de isomerases peptidylprolyl (PPIases). As ciclofilinas, como também são conhecidas, são altamente conservadas e ubíquas. Os membros dessa família desempenham um papel importante no “folding” de proteínas catalisando a isomerização cis-trans de ligações peptídicas do grupo imídico de prolinas (Hunter 1998).

Risal e colaboradores sugeriram que a elevada expressão de PPIL1 está relacionada ao crescimento de células de câncer de cólon (Risal et al. 2012). Não há relatos na literatura que a relacionem com neoplasias mamárias, tampouco com o desenvolvimento de metástases.

A)

Gene	Status no Microarray	Peso em kDa	Variantes de splicing
PPIL1	Aumentado	26	1

B)



C)

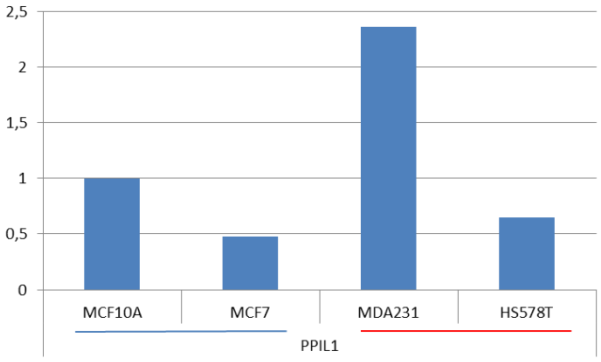


Figura S1. *Western blot* realizado com anticorpos anti-PPIL1 nas linhagens celulares. A) Quadro mostra o status aumentado de *PPIL1* em pacientes que desenvolveram metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. Indica ainda que PPIL1 possui apenas uma variante de splicing com peso molecular de 26 kDa. **B)** *Western blot* mostrando a imunodetecção da proteína PPIL1, como indicado pela seta inferior. As bandas encontradas correspondem a isoforma descrita de 26 kDa A seta superior refere-se às bandas de actina, que foram utilizadas como normalizador. **C)** Gráfico representa a intensidade relativa de cada banda de PPIL1 detectada no *western blot.* Houve aumento da abundância proteica de PPIL1 na linhagem mesenquimal/metastática MDA-MB-231 quando comparada as linhagens epiteliais/não metastáticas MCF10A e MCF7.

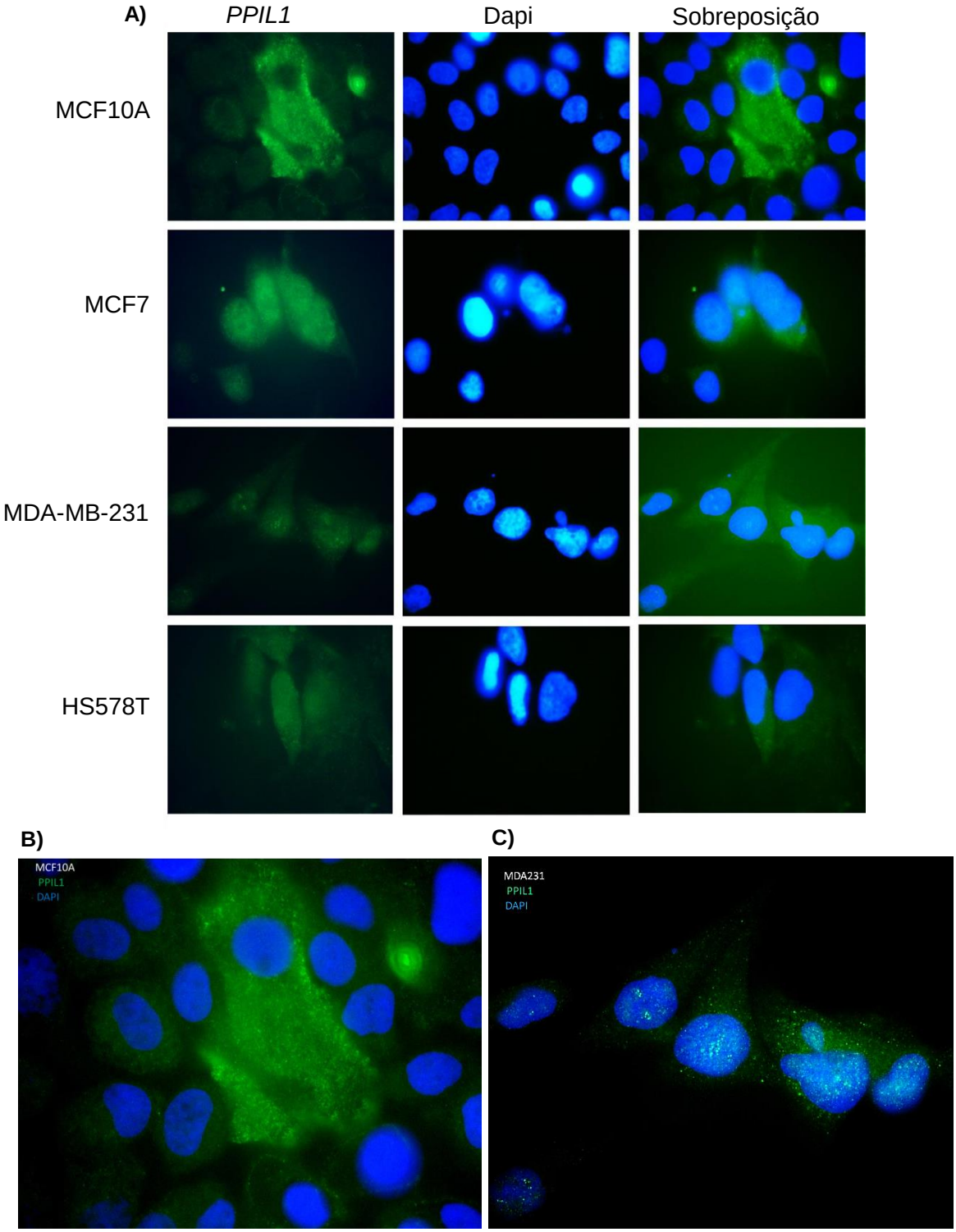


Figura S2. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-PPIL1 nas linhagens celulares. A) Painel mostra as imagens de imunofluorescência contra PPIL1 nas 4 linhagens testadas. Houve marcação citoplasmática e nuclear de maneira difusa em todas as linhagens. Além disso, é possível perceber que a marcação de PPIL1 na linhagem MDA-MB-231 evidenciou aglomerações nucleares de forma não observada nas outras linhagens. Em **B)** e **C)**, podem ser comparadas as linhagens MCF10A e MDA-MB-231 , respectivamente, em imagens ampliadas.

ITGAV

Integrinas servem como receptores importantes para a matriz extracelular (MEC), mediando adesão e migração celular, organização do citoesqueleto, proliferação celular, sobrevivência e diferenciação. Integrina alfa-V (*ITGAV*) pode reconhecer, através de seus domínios RGD (comum a todas as integrinas), uma variedade de ligantes como vitronectina, fibronectina, osteopontina, sialoproteína óssea, trombospondina, fibrinogênio, fator de von Willebrand, tenascina e agrin (Helfrich et al. 1992; Schnapp et al. 1995; Sung et al. 1998). Um trabalho recente demonstrou o envolvimento desta integrina, em conjunto com βV, na ativação da via Akt. Isto confere proteção à apoptose TRAIL-dependente em câncer de ovário ascítico (Lane et al.). Outro trabalho mostrou que anticorpos contra *ITGAV* (CNTO95) inibem o crescimento celular, migração e invasão através da interrupção de vias mediadas pelas adesões focais (FAK) e os sinais de motilidade celular (Chen et al. 2008). Borrirukwanit e colaboradores demonstraram que integrina alfaV beta3 inibe metaloproteinases (MT1-MMP e MMP2) em células humanas de câncer de mama (Borrirukwanit et al. 2007). Lu e colaboradores sugerem que o gene *ITGAV* pode tornar-se um marcador de prognóstico e alvo promissor novo tratamento para carcinoma escamoso de laringe (Lu et al. 2009). Schittenhelm e colaboradores demonstraram que a superexpressão de ITGAV favorece a piores prognósticos em gliomas (Hollestelle et al. 2010). Em outro estudo, Denadai e colaboradores sugeriram, por PCR em tempo real e TMA, que a expressão dessa integrina está associada com tumores de alto grau (TMN III) e aumenta as riscos de invasão vascular e neural . Liu e colaboradores demostraram que o silenciamento transcricional de ITGAV (mediado por MYC) provoca uma supressão na

disseminação de metástases em enxertos de linhagens de células tumorais de mama inoculados em camundongos (Liu et al. 2012).

A)

Símbolo	Status no Microarray	Peso em kDa	splicing
ITGAV	Aumentado	111, 112 e 116	3

B)

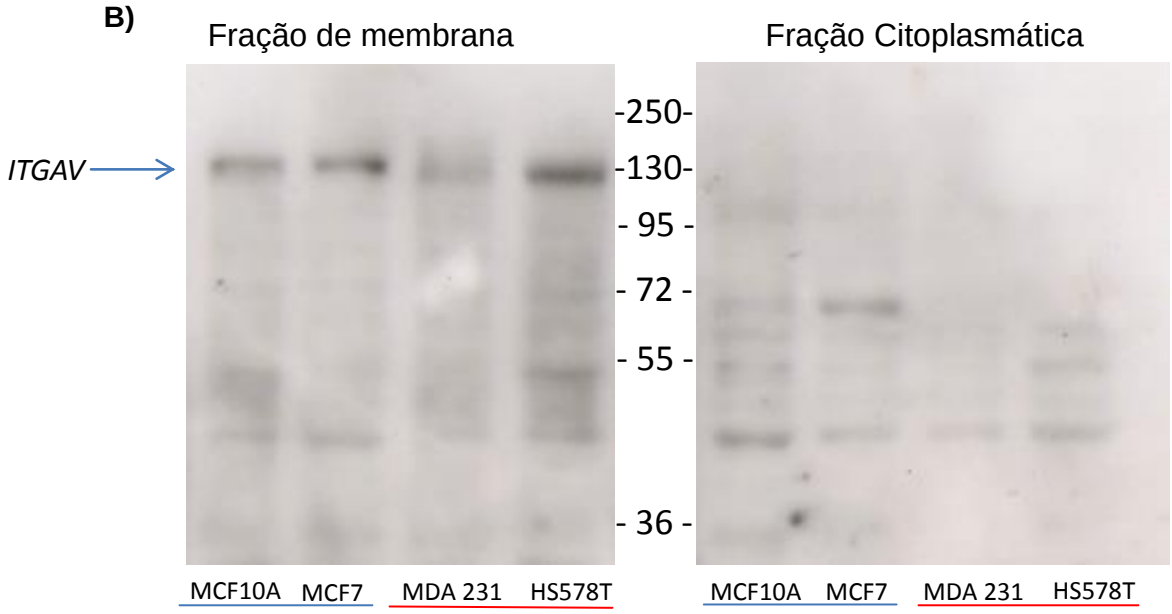


Figura S3. *Western blot* realizado com anticorpos anti-ITGAV nas linhagens celulares. A) Quadro mostra o status aumentado de *ITGAV* em pacientes desenvolveram metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. Além disso, indica que *ITGAV* que possui 3 variantes de splicing com pesos moleculares de 111, 112 e 116 kDa. **B)** *Western blot* mostrando a imunodetecção da proteína ITGAV, como indicado pela seta. A detecção ocorreu somente nos extrato proteicos obtidos através de centrifugação diferencial, que deu origem a fração de membrana. Não foi possível a co-imunomarcação de proteínas normalizadoras e, por isso, não foi possível determinar a abundância relativa de ITGAV entre as diferentes linhagens testadas. Aparentemente, há maior abundância de ITGAV na linhagem HS578T, se considerada a mesma quantidade de proteína aplicada por poço (50µg).

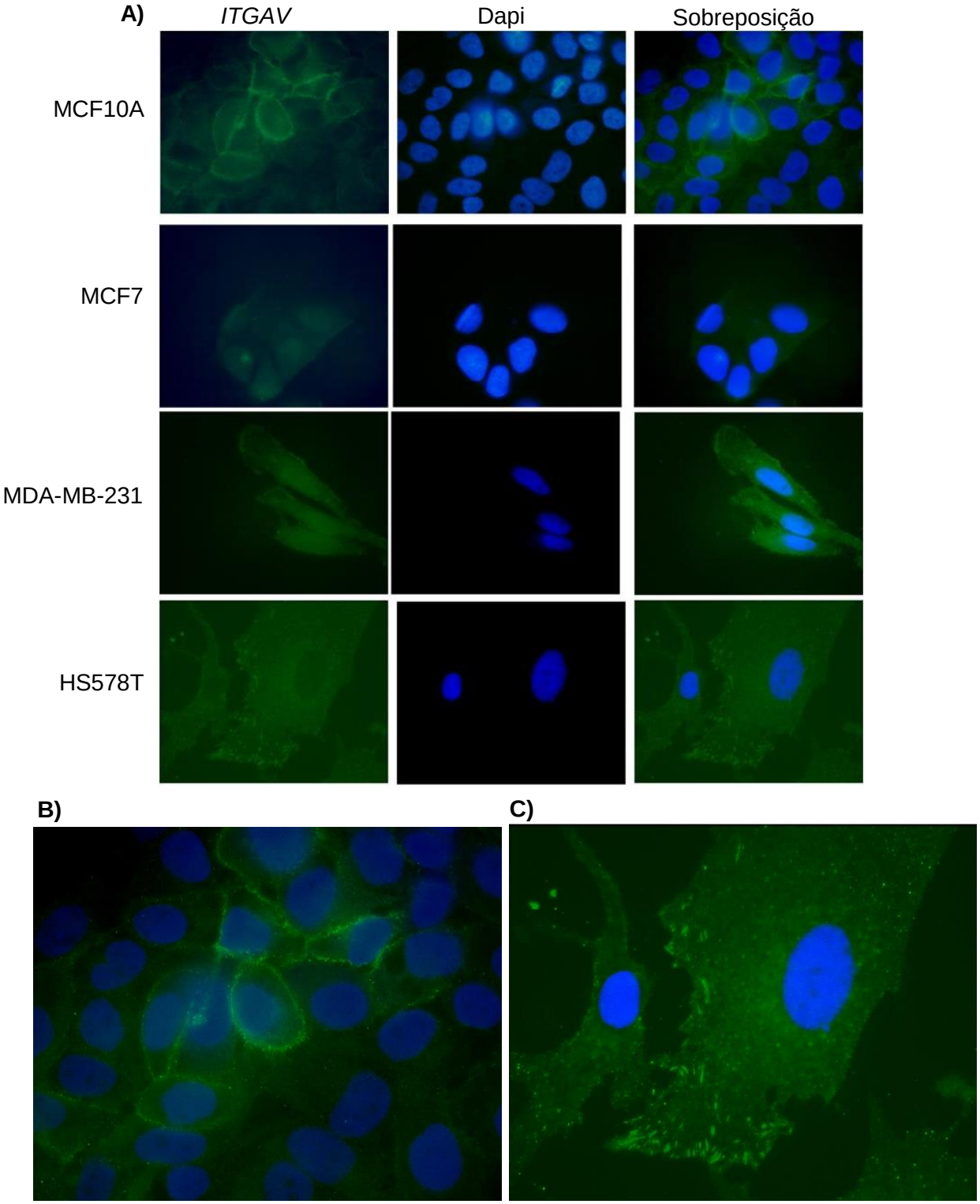


Figura S4. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-ITGAV nas linhagens celulares. A) Painel mostra as imagens de imunofluorescência contra ITGAV nas 4 linhagens testadas. É possível perceber que a marcação de ITGAV em MCF10A ocorreu principalmente na membrana citoplasmática. Um padrão diferente de localização é observado na linhagem HS578T que, apesar de aparentemente estar na membrana citoplasmática, mostrou-se enriquecida em apenas algumas regiões e em forma de *foci*. Em **B** e **C**, podem ser comparadas as linhagens MCF10A e HS578T, respectivamente, em imagens ampliadas.

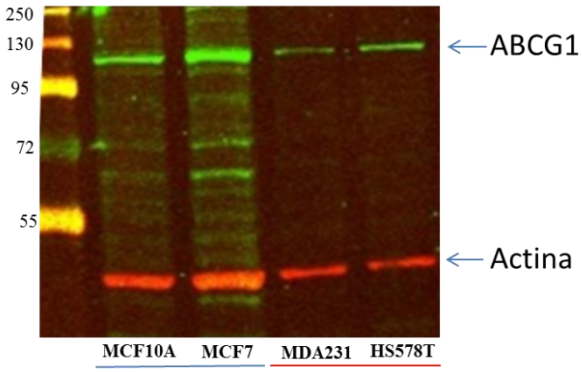
ABCG1

A proteína codificada por este gene é um membro da superfamília de transportadores *ATP-binding cassete* (ABC). Atua como regulador do transporte de colesterol e fosfolipídeos em macrófagos (Klucken et al. 2000) e pode também regular a homeostase lipídica celular em outros tipos celulares (Jakobsson et al. 2009). O silenciamento de *ABCA1*, mas não *ABCG1*, inibiu a proliferação celular, a migração e a transdução via ERK1/2 e Akt induzidas por HDL em células de câncer prostático humano PC-3 (Sekine et al.). ABCG2 foi descrito como um dos fatores que conferem resistência de células de câncer de mama ao tratamento quimioterápico. Age como transportador no efluxo multidrogas (Janvilisri et al. 2003). Outro trabalho demonstrou que, utilizando LXR, houve indução de ABCG1 que por sua vez efluxo de colesterol em células MCF7, resultando na inibição da proliferação celular e estímulo a apoptose (El Roz et al. 2012).

A)

Símbolo	Status no Microarray	Peso em kDa	Variantes de splicing
ABCG1	Aumentado	Entre 74 e 76 (110*)	6

B)



C)

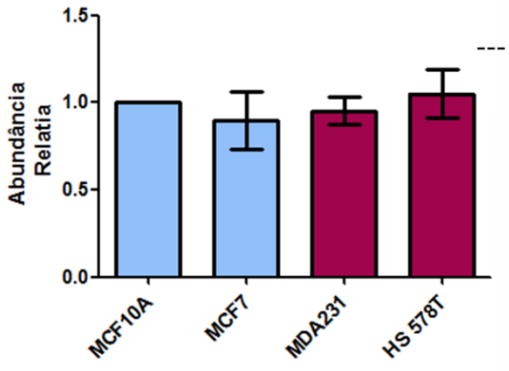


Figura S5. *Western blot* realizado com anticorpos anti-ABCG1 nas linhagens celulares. A) Quadro mostra o status aumentado de *ABCG1* em pacientes que desenvolveram metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. Indica ainda *ABCG1* possui 6 variantes de *splicing* com pesos moleculares variando de 74 a 76 kDa. A descrição do anticorpo fornecida pela empresa fabricante do anticorpo (ABCAM) mostra que o anti-ABCG1 reconhece bandas de 110 kDa. **B)** *Western blot* mostrando a imunodetecção da proteína ABCG1, como indicado pela seta superior. As bandas encontradas correspondem a aproximadamente 110 kDa. A seta inferior refere-se às bandas de actina, que foram utilizadas como normalizador. É possível ainda notar bandas de aproximadamente 74 kDa, peso previsto para esta proteína. **C)** Gráfico representa a intensidade relativa de cada banda de ABCG1 detectada no *western blot* Não houve diferenças na abundância proteica de *ABCG1* entre as linhagens testadas.

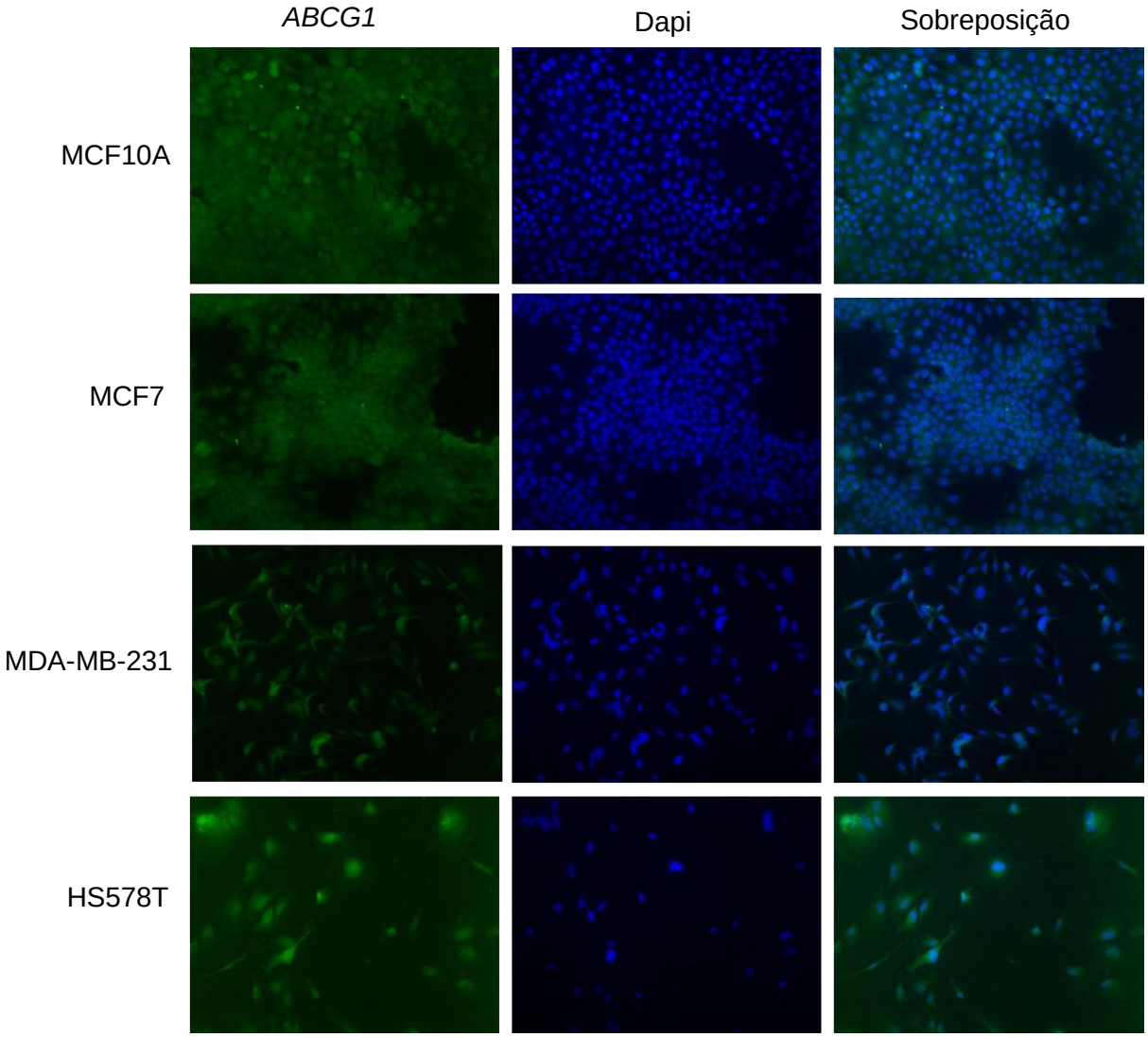
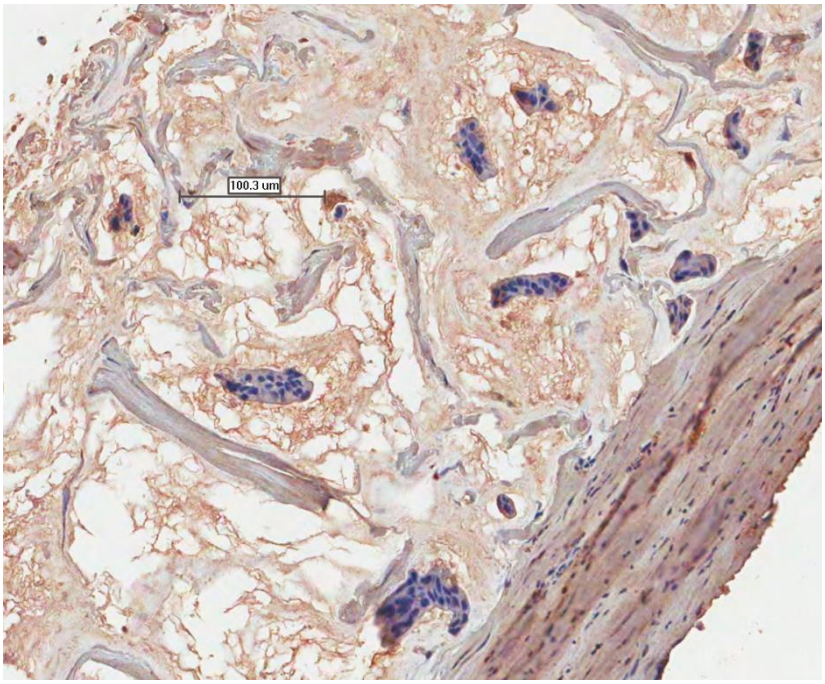


Figura S6. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-ABCG1 nas linhagens celulares. O painel mostra as imagens de imunofluorescência contra ABCG1 nas 4 linhagens testadas. Comparativamente, é possível perceber que não há diferenças de marcação entre as linhagens. O que é concordante com as quantificações relativas feitas por *western blot* (FiguraS5). As imunomarcaçãoes mostraram fraca intensidade e localização difusa de ABCG1. As imagens foram captadas com a objetiva de 20x no microscópio de imunofluorescência .

A)



B)

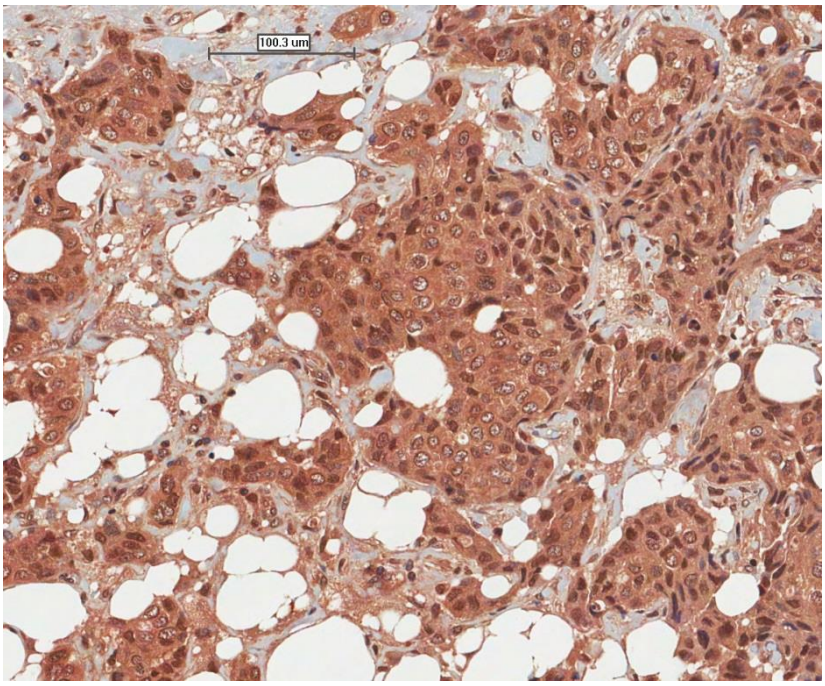


Figura S7. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para ABCG1. A) Os grupos de células marcadas nesse caso tiveram positividade 0,47, valor que foi o segundo mais baixo dentre as positividades encontradas para esta proteína. **B)** A Fotomicrografia deste caso, assim como a maioria dos outros, mostraram alta positividade, 0,96. Além de forte imunomarcação citoplasmática, é possível vê-la também no núcleo de algumas células. Ambos os casos são integrantes do mesmo bloco de TMA e foram submetidas às mesmas condições de imunohistoquímica. As linhas pretas indicam as medidas de 100µm aferidas na captura da imagem.

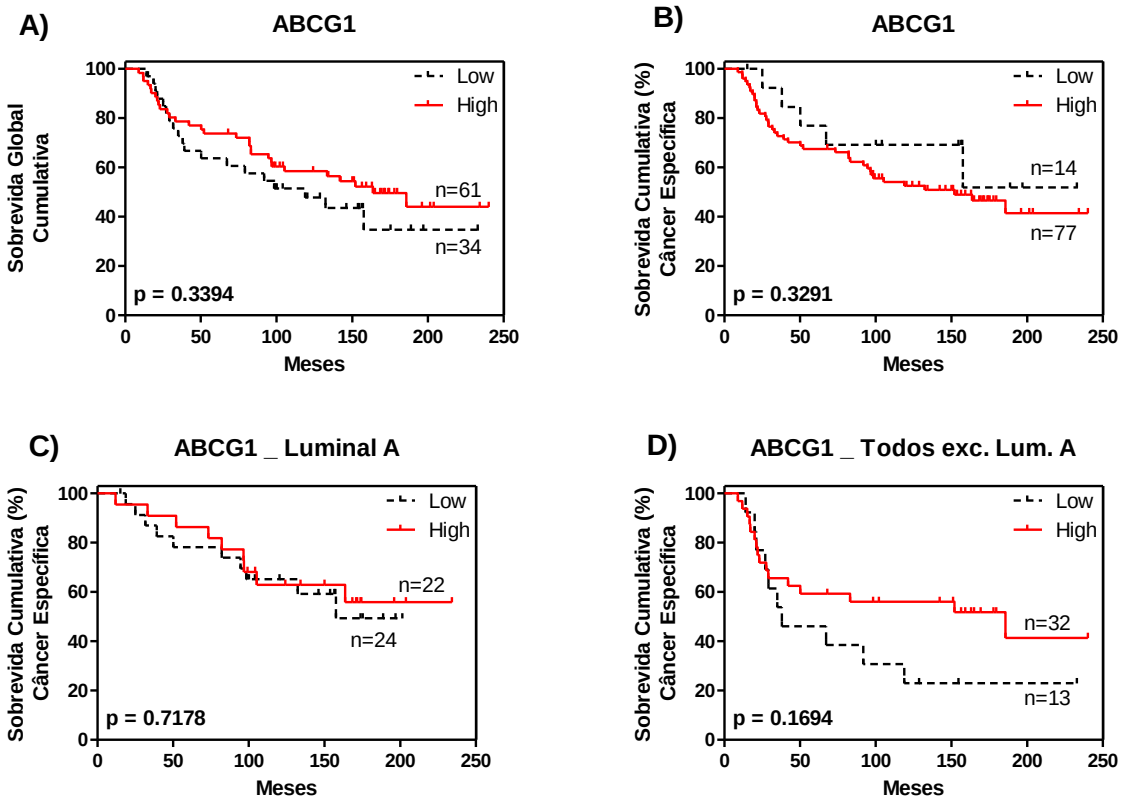


Figura S8: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de ABCG1. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama (Valor de corte de positividade: 0.95). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica. (Valor de corte de positividade: 0,92). **C)** Sobrevida câncer específica considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,96). **D)** Sobrevida câncer específica considerando todos os pacientes, exceto aqueles do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,94).

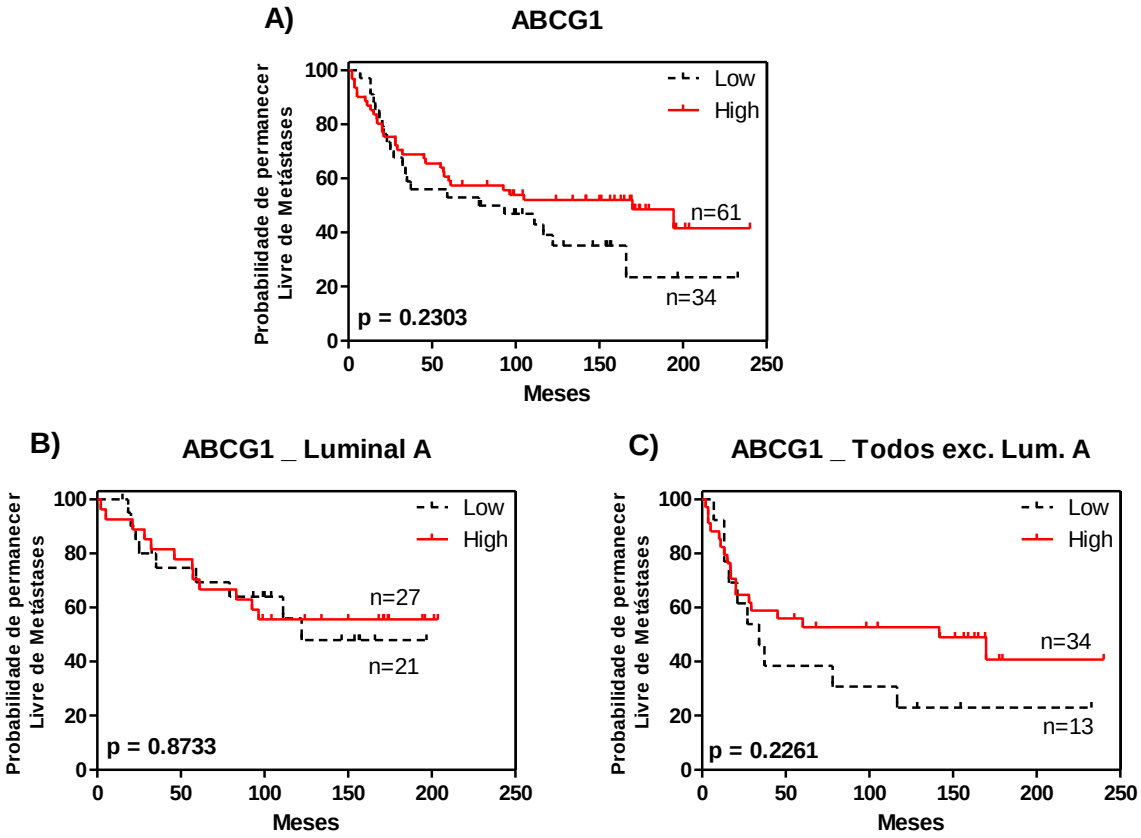


Figura S9: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de ABCG1. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástases no conjunto total dos pacientes estudados (Valor de corte de positividade: 0,94). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,94). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes exceto Luminal A (Valor de corte de positividade: 0,94).

MICA

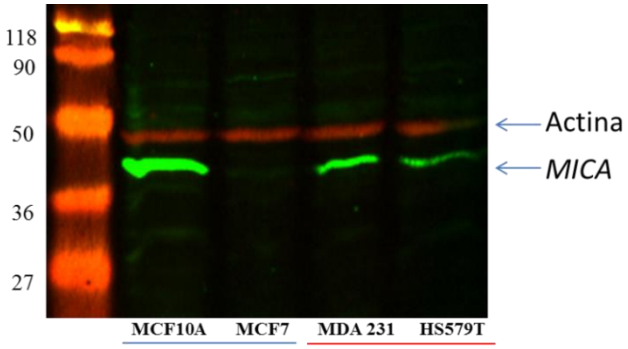
O complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I é codificado por genes polimórficos cujos produtos medeiam o reconhecimento de antígenos intracelulares por células T citotóxicas (Groh et al. 1998). Motivados pela associação de HLA-B27 com doenças inflamatórias e reumáticas, Bahram e colaboradores encontraram uma família de sequências no MHC humanos, *MHC class I chain-related gene –MIC*, que é altamente divergente de todos os genes classe MHC I conhecidos (Bahram, Bresnahan et al. 1994). Os genes *MIC* (A e B) presumivelmente derivaram de genes MHC I no início da evolução dos mamíferos, e ramificaram ao longo do tempo.

O gene MICA foi caracterizado como pertecente a superfamilia das MHC (MHC-I Class related, MIC) e codifica um polipeptídeo com massa prevista de 43 kDa (Bahram, Bresnahan et al. 1994), embora estejam também descritas múltiplas variantes originadas por *splicing* alternativo. Pode estar presente na membrana celular, como também pode ser secretado, que neste caso parece não estar associado a cadeia β2-microglobulina (Arreygue-Garcia et al. 2008). MICA é um ligante de NKG2-D, que está expressa em células do sistema imune como linfócitos T gamma/delta T cells, CD8+ e Natural Killer (NK) (Bauer et al. 1999). Foi sugerido que esta interação impede a maturação de linfócitos T (Groh et al. 2002). São crescentes as evidências de que isto possa estar de alguma forma modulando negativamente a resposta imune anti-tumoral (Arreygue-Garcia, Daneri-Navarro et al. 2008).

A)

Símbolo	Status no Microarray	Peso em kDa	Variantes de splicing
MICA	Diminuido	36 e 43	2

B)



C)

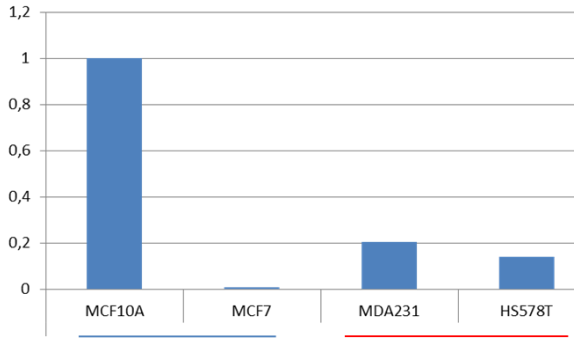


Figura S10. *Western blot* realizado com anticorpos anti-MICA nas linhagens celulares. A) Quadro mostra o status diminuido de MICA em pacientes desenvolveram metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. Além disso, indica que possui 2 variante de splicing com pesos moleculares de 36 e 43 kDa. **B)** Western blot mostrando a imunodetecção da proteína MICA, como indicado pela seta inferior. As bandas encontradas aparentemente correspondem a isoforma de 43 kDa. A seta superior refere-se às bandas de actina, que foram utilizadas como normalizador. **C)** Gráfico representa a intensidade relativa de cada banda de MICA detectada no western blot Ao contrário do observado em PCR em tempo real para os transcritos, houve diminuição da abundância proteica de MICA nas linhagens mesenquimais/metastáticas HS578T e MDA-MB-231 quando comparada a epitelial/não tumoral MCF10A. Convém salientar que que MICA pode ser secretada para fora da célula e nenhuma medida foi feita no sobrenadante de cultivo. O que foi observado aqui foram apenas extratos proteicos das linhagens utilizadas de apenas uma réplica biológica.

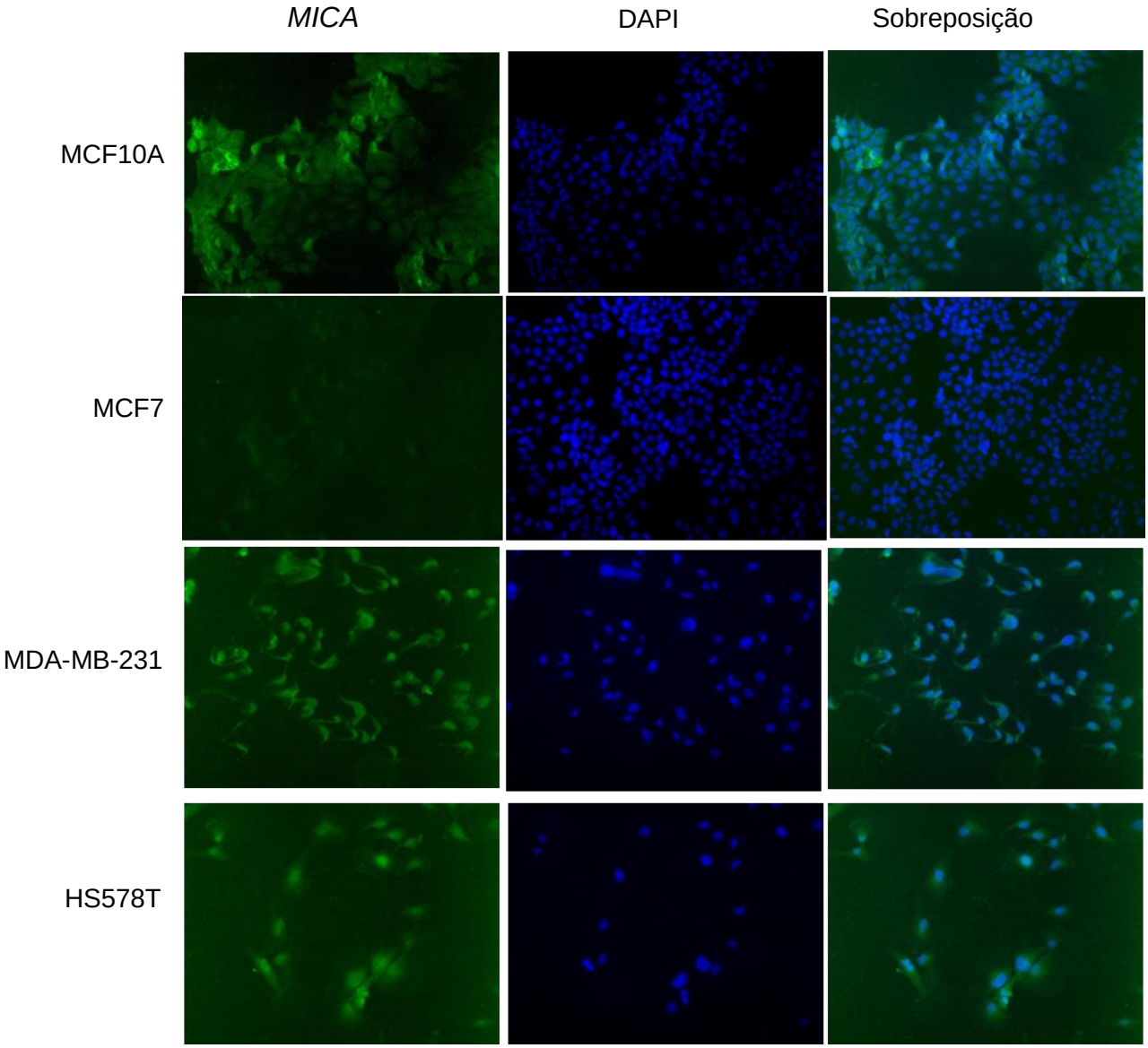


Figura S11. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-MICA nas linhagens celulares. O painel mostra as imagens de imunofluorescência contra MICA nas 4 linhagens testadas. É possível perceber que a linhagem MCF7 mostra menor intensidade de marcação quando comparadas às outras linhagens. O que é concordante com as quantificações relativas feitas por *western blot* (Figura S10). De uma maneira geral, a marcação de MICA mostrou fraca intensidade e localização celular difusa. As imagens foram captadas com a objetiva de 20x no microscópio de imunofluorescência.

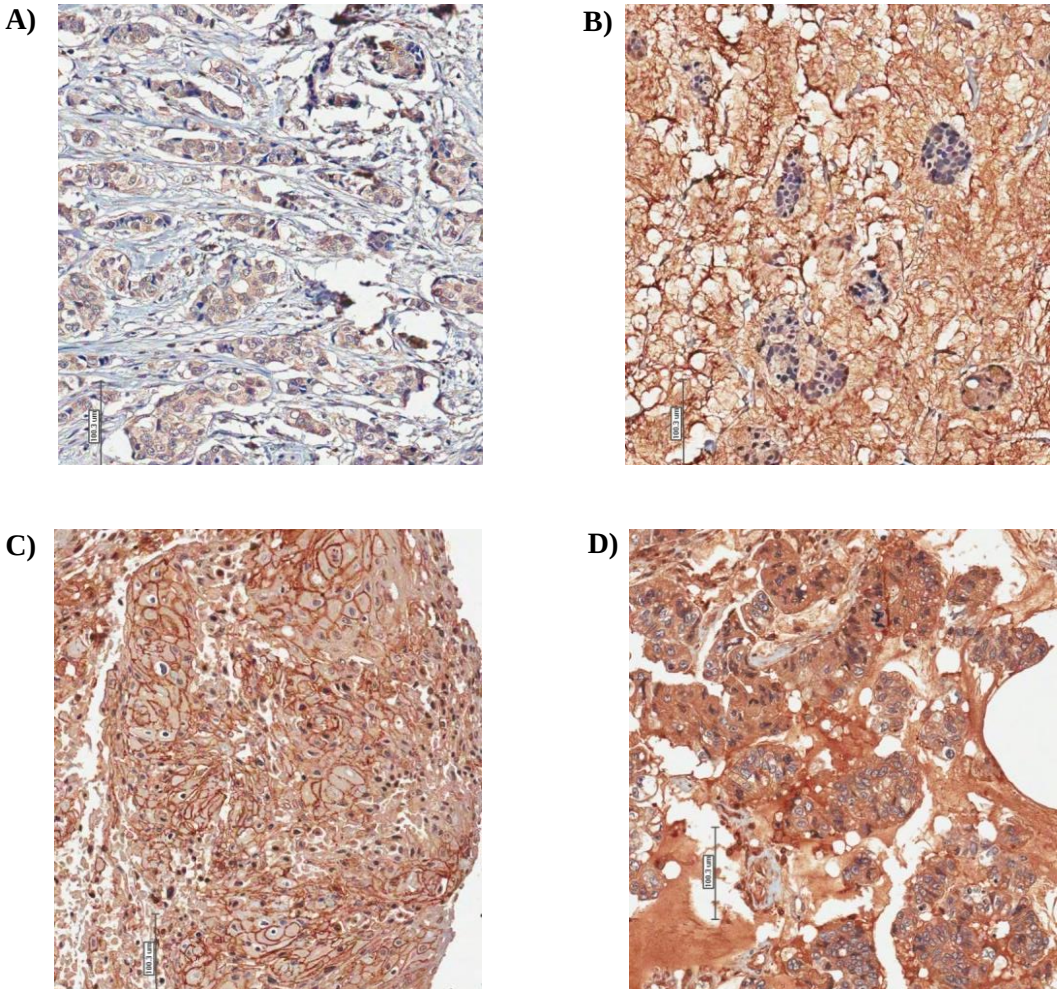


Figura S12. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para MICA. A) Fotomicrografia demonstrando a detecção imunohistoquímica de MICA, evidenciando sua localização citoplasmática. A positividade encontrada neste caso foi de 0,43. A matriz extracelular adjacente não apresentou marcação imunohistoquímica para esta proteína, preservando sua tonalidade hialina azul-clara. **B)** Imagem representativa de caso com maior intensidade de marcação imunohistoquímica para MICA. A positividade de 0,76 encontrada, reflete apenas as células epiteliais do parênquima mamário devidamente delimitadas para a análise. No entanto, a matriz extracelular apresenta coloração carcterística da imunodeposição de DAB. **C)** Os grupamentos celulares mostrados neste caso, evidenciam a localização de MICA na membrana citoplasmática, além de citoplasmática como já observada nos casos anteriores. A intensa marcação imunohistoquímica de MICA neste caso resultou na positividade de 0,96. **D)** Neste caso, tanto os grupamentos celulares, quanto a área de matriz extracelular mostraram forte imunodeposição de DAB. A positividade encontrada foi de 0,96 e, assim como nos casos previamente abordados, foi calculada excluindo-se as áreas de matriz extracelular e demais componentes do estroma. Todos os casos acima são constituintes do mesmo bloco de TMA sendo submetidas exatamente às mesmas condições e concentrações do anticorpo primário anti-MICA. As barras transversais no canto inferior esquerdo indicam 100µm.

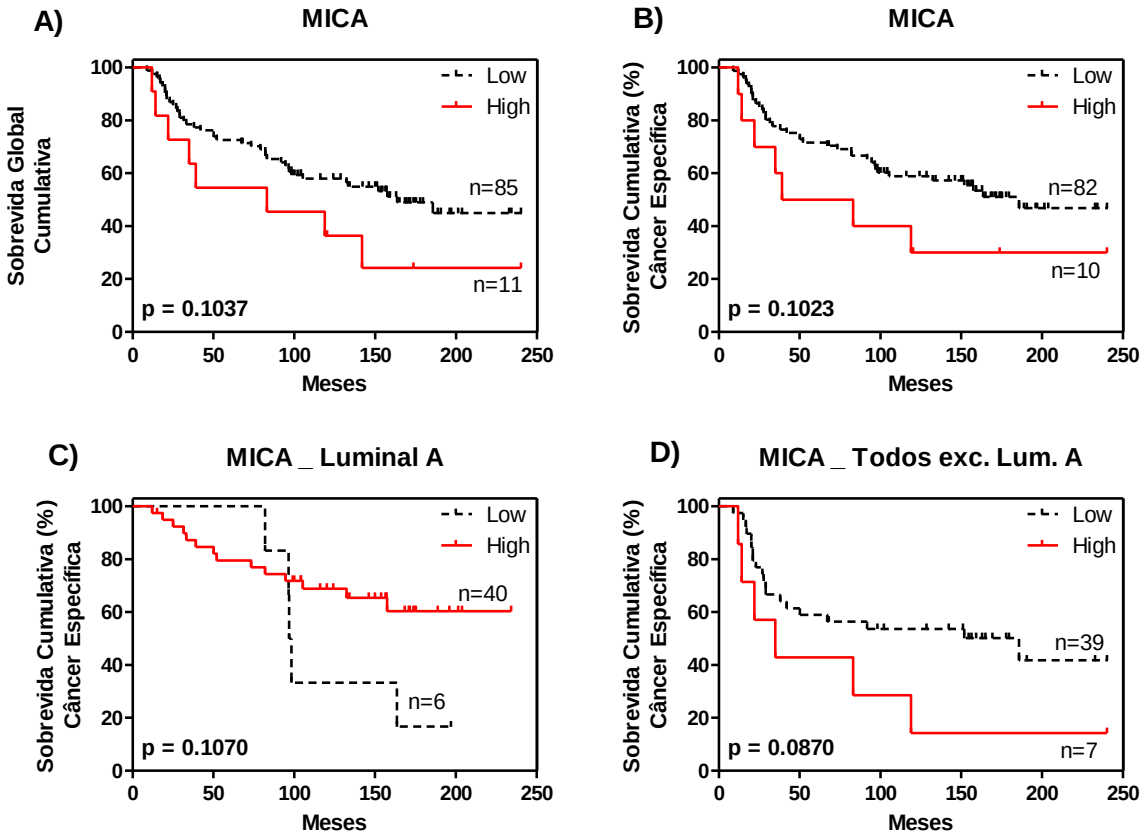


Figura S13: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de MICA. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama (Valor de corte de positividade: 0.95). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica. (Valor de corte de positividade: 0,95). **C)** Sobrevida câncer específica considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,67). **D)** Sobrevida câncer específica considerando todos os pacientes, exceto aqueles do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,95).

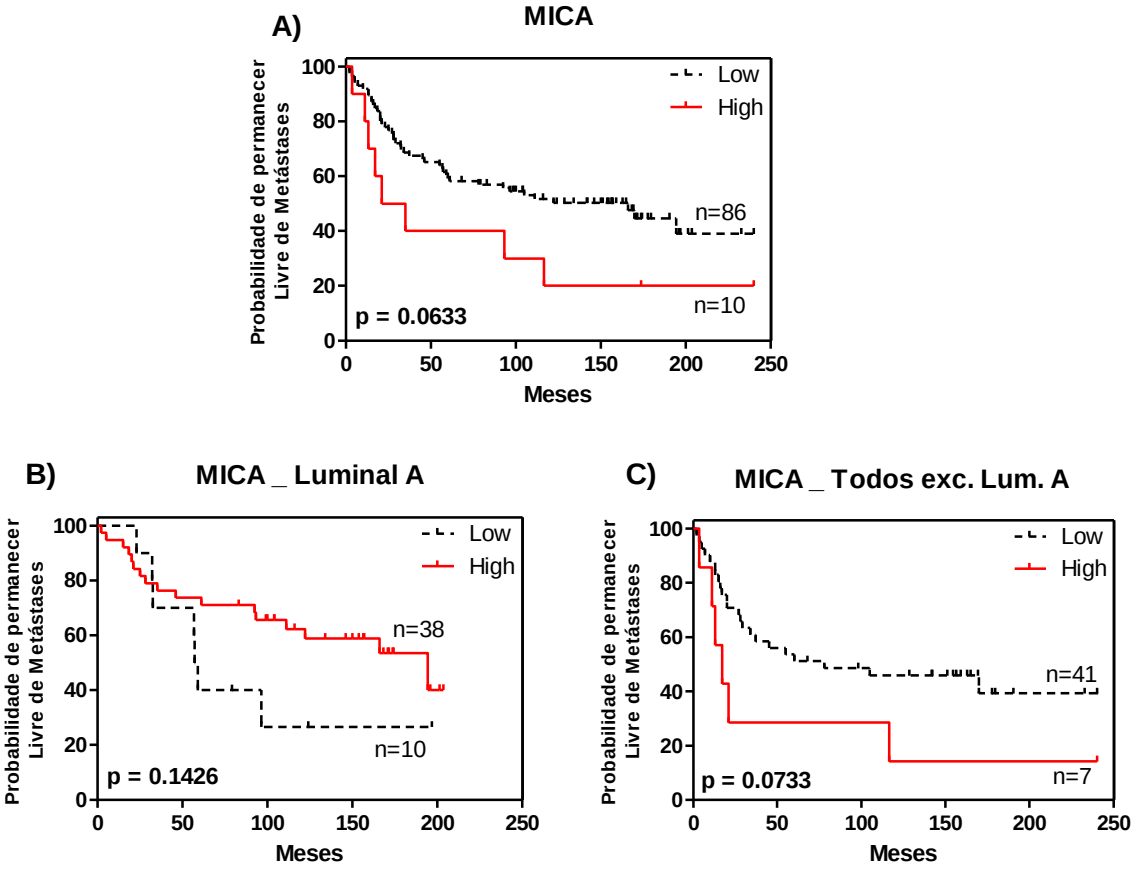


Figura S14: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de MICA. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase no conjunto total dos pacientes estudados (Valor de corte de positividade: 0,95). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,69). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,95).

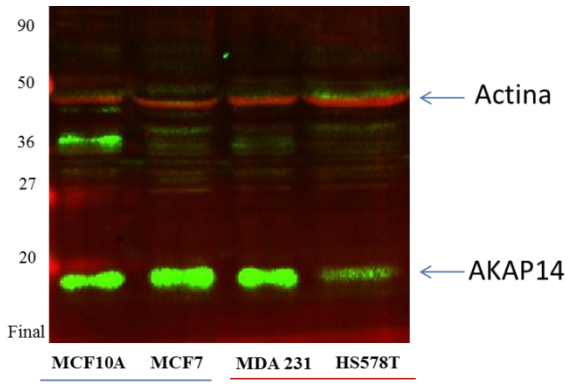
AKAP14

Âncoras de proteínas quinase A (AKAPs) são um grupo de proteínas estruturalmente diversas, que têm a função comum de ligação com a subunidade reguladora da proteína quinase A (PKA) e restringindo o holoenzima a locais específicos dentro da célula (Trendelenburg et al. 1996). Este gene codifica um membro específico da família AKAP, o AKAP14 (também conhecida como AKAP28). As AKAPs são encontradas em axonemas ciliares possivelmente desempenhando um papel na regulação da frequência de batimento ciliar (Kultgen et al. 2002). Saini e colaboradores indicaram que esta proteína como marcador de prognóstico em câncer de mama, utilizando 91 amostras de tumores de mama por imunohistoquímica e hibridização de RNAs *in situ* (Saini et al. 2013). Contudo, os autores não avaliaram a expressão de AKAP14 nos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama.

A)

Símbolo	Status no Microarray	Peso em kDa	Variantes de splicing
AKAP14	Aumentado	10, 16 e 28	3

B)



C)

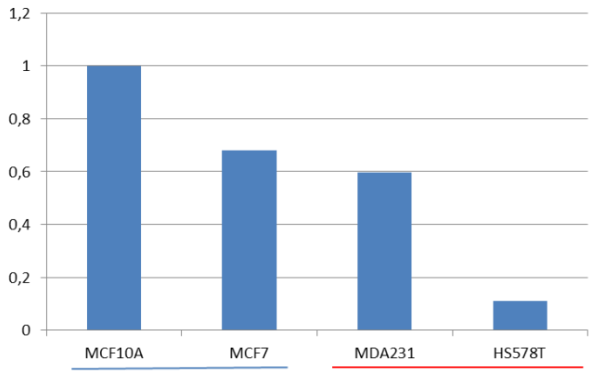


Figura S15. *Western blot* realizado com anticorpos anti-AKAP14 nas linhagens celulares. A) Quadro mostra o status aumentado de *AKAP14* em pacientes desenvolveram metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. Além disso, indica que possui 3 variante de *splicing* com pesos moleculares de 10, 16 e 28 kDa. **B)** *Western blot* mostrando a imunodetecção da proteína AKAP14, como indicado pela seta inferior. A seta superior refere-se às bandas de actina, que foram utilizadas como normalizador. As bandas encontradas aparentemente correspondem a isoforma de 16 kDa. Na linhagem MCF10A foi detectada uma banda adicional mais pesada de aproximadamente 36 kDa. **C)** Gráfico representa a intensidade relativa de cada anda de AKAP14 detectada no *western blot.* Aparentemente, há diminuição da abundância proteica de AKAP14 na linhagem mesenquimal/metastática HS578T quando comparada a epitelial/não tumoral MCF10A.

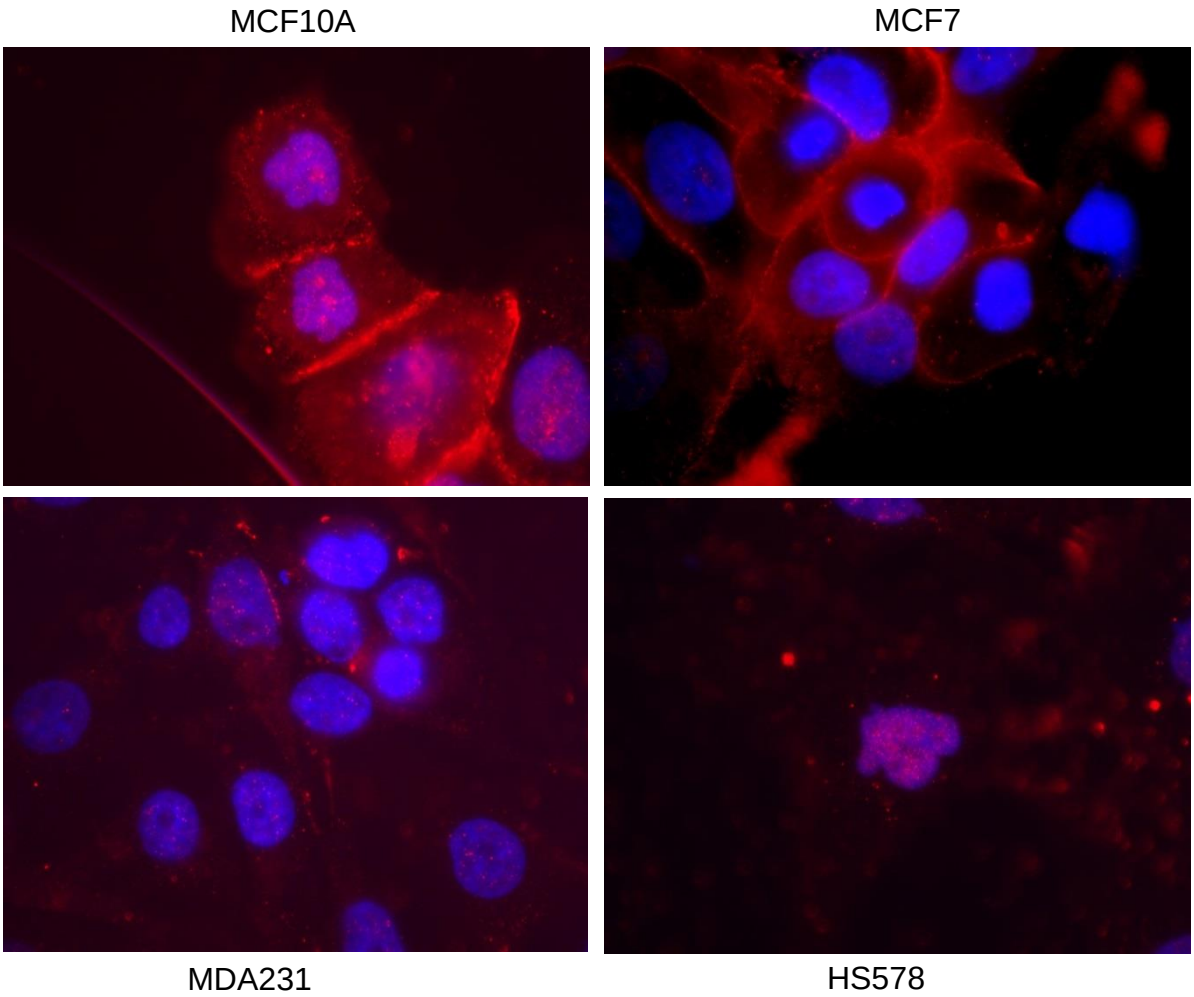
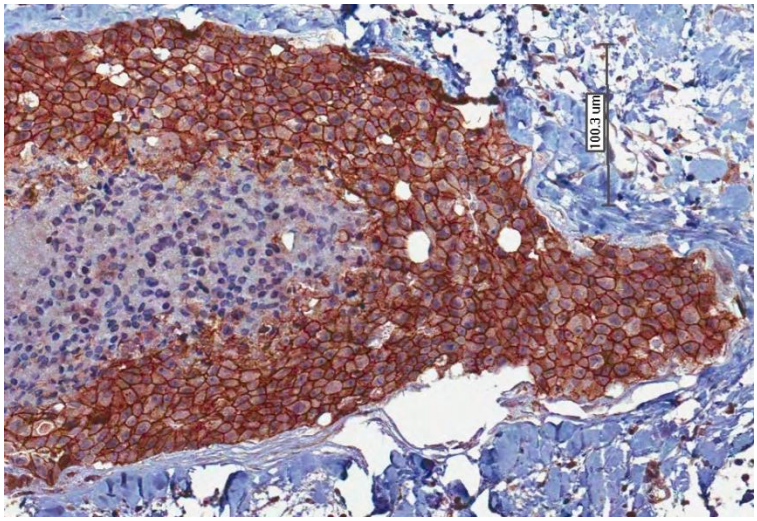


Figura S16. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-*AKAP14* nas linhagens celulares. O painel mostra as imagens de imunofluorescência contra *AKAP14* nas 4 linhagens testadas. É possível visualizar acúmulo desta proteína na membrana celular na linhagem epitelial / não tumoral MCF10A e MCF7. Nas linhagens Mesenquimais / Metastáticas MDA-MB-231 e HS578T, não se observa a mesma localização na membrana, apresentando apenas uma fraca e difusa marcação no citoplasma.

A)



B)

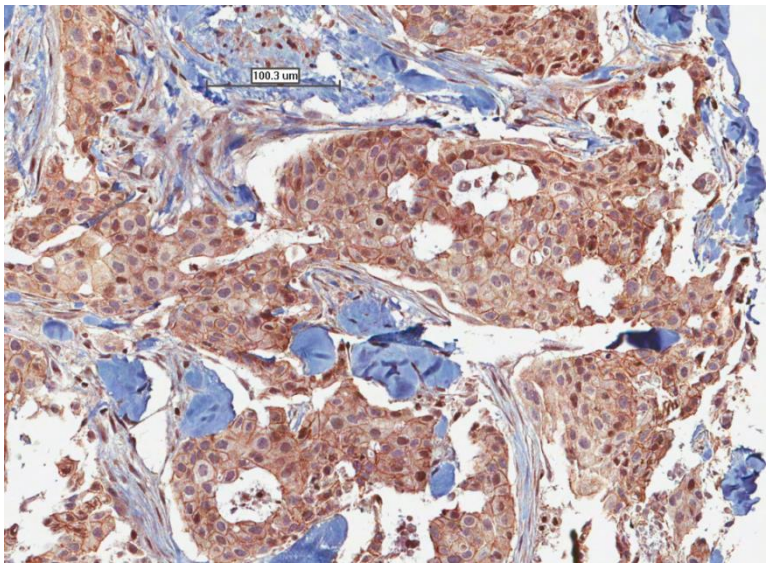


Figura S17. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para AKAP14. A) Fotomicrografia demonstrando a detecção imunohistoquímica de AKAP14, que neste caso mostrou localização predominante na membrana celular. A positividade encontrada neste caso foi de 0,85. **B)** Caso representativo de reação imunohistoquímica que demonstrou a localização nuclear de AKAP14 em muitas das células expostas na Fotomicrografia. Entretanto, a localização de membrana, apesar de presente, não foi tão marcante quanto no caso anterior (painél A). A positividade encontrada neste caso foi de 0,82 (semelhante ao caso anterior). Em ambos os casos é possível observar a localização citoplasmática de AKAP14. Esta sequência de imagens é compátivel com os achados de imunofluorescência realizados nas linhagens celulares (Figura S16). As barras (vertical em a) e horizontal em b)) indicam 100µm.

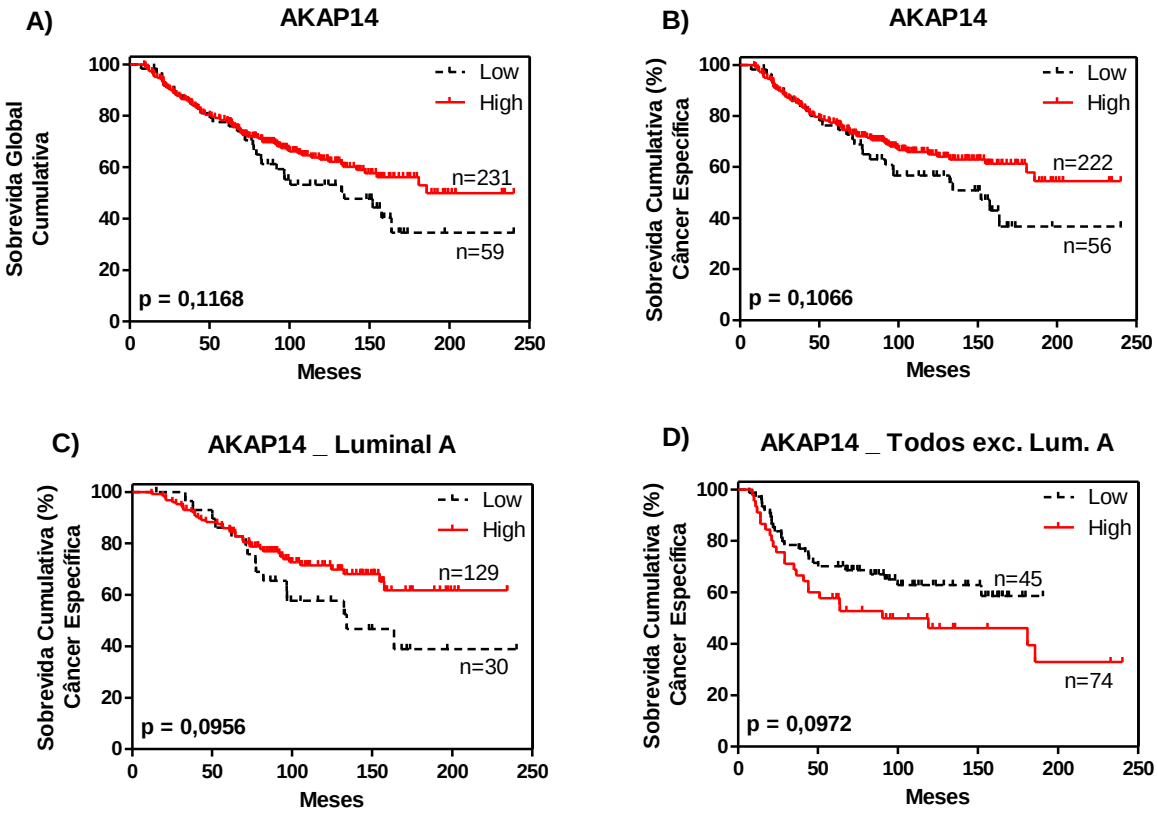


Figura S18: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de AKAP14. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama (Valor de corte de positividade: 0,15). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica (Valor de corte de positividade: 0,15). **C)** Sobrevida global apenas os pacientes do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,14). **D)** Sobrevida câncer específica considerando todos os pacientes, exceto aqueles do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,39).

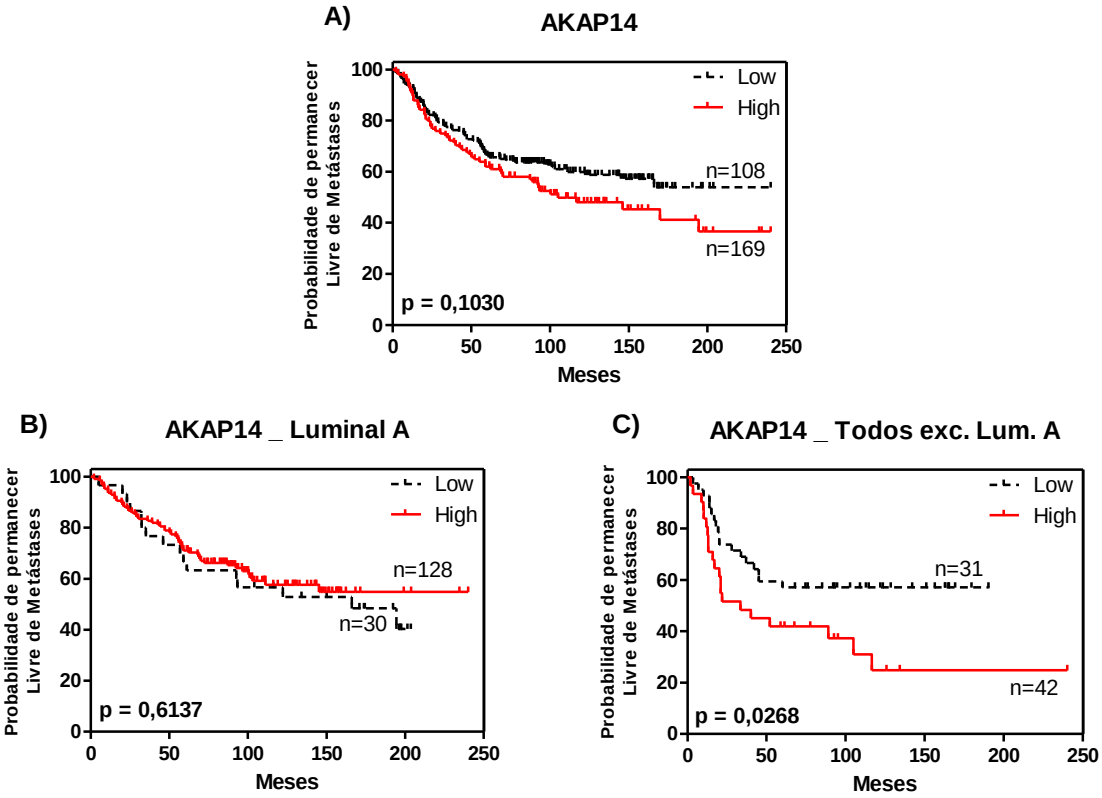


Figura S19: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de AKAP14. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase no conjunto total dos pacientes estudados (Valor de corte de positividade: 0,38). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,18). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,22).

FXYD1

O gene FXYD1, também conhecido como Dysadehrin ou *phospholemman* codifica uma uma glicoproteína que se localiza na membrana plasmática, e que é fosforilada em resposta à insulina (Chen et al. 1997) e sensível às mudanças provenientes de estimulação adrenérgica (Chen et al. 1997). Adicionalmente, PLM pode servir de substrato na membrana plasmática para várias quinases, incluindo proteína quinase A (PKA), a proteína quinase C (PKC) e NIMA quinase (Franzin et al. 2007). Sua função foi documentada como uma proteína acessória da bomba Na +, K + / ATPase (Feschenko et al. 2003; Teriete et al. 2007). Um trabalho demonstrou que FXYD1 diferencialmente expresso em sarcomas (Takahashi et al. 2006). Posteriormente, Lee e colaboradores verificaram que a expressão de Dysadehrin promove motilidade e estímulos de sobrevivência em células de câncer de mama via sinalização de Akt (Lee et al. 2012). Além disso, alguns trabalhos a sugeriram como marcador de prognóstico, tumores de pâncreas, pulmão, gástricos e de mama (Ino et al. 2002; Shimamura et al. 2004; Nam et al. 2006; Mitselou et al. 2010; Ono et al. 2010; Maehata et al. 2011).

A)

Símbolo	Status no Microarray	Peso em kDa	Variantes de splicing
FXYD1	Diminuido	10	1

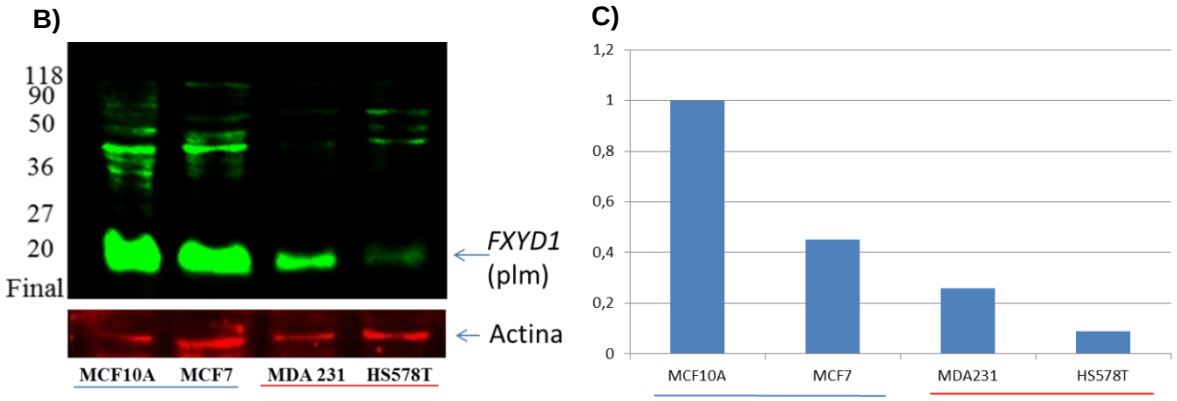


Figura S20. *Western blot* realizado com anticorpos anti-FXYD1 nas linhagens celulares. A) Quadro mostra o *status* diminuído de *FXYD1* em pacientes que desenvolveram metástases nos 5 anos seguintes à mastectomia. Indica ainda que possui apenas uma variante de *splicing* e o peso molecular descrito, que é de 10 kDa. **B)** *Western blot* mostrando a imunodetecção da proteína Phospholeman (Plm). Foram detectadas bandas de peso molecular compatível ao esperado, embora algumas bandas interferentes, de menor intensidade, também apareceram. Abaixo podem ser visualizadas as bandas da actina, que foram utilizadas como normalizadores. **C)** Gráfico representa a intensidade relativa de cada banda de Plm detectada no *western blot*. Houve diminuição da abundância de Plm nas linhagens mesenquimais/metastáticas (sublinhada em vermelho) quando comparadas as linhagens luminal-epiteliais (sublinhada em azul). Entretanto, esta quantificação foi feita com apenas uma réplica biológica.

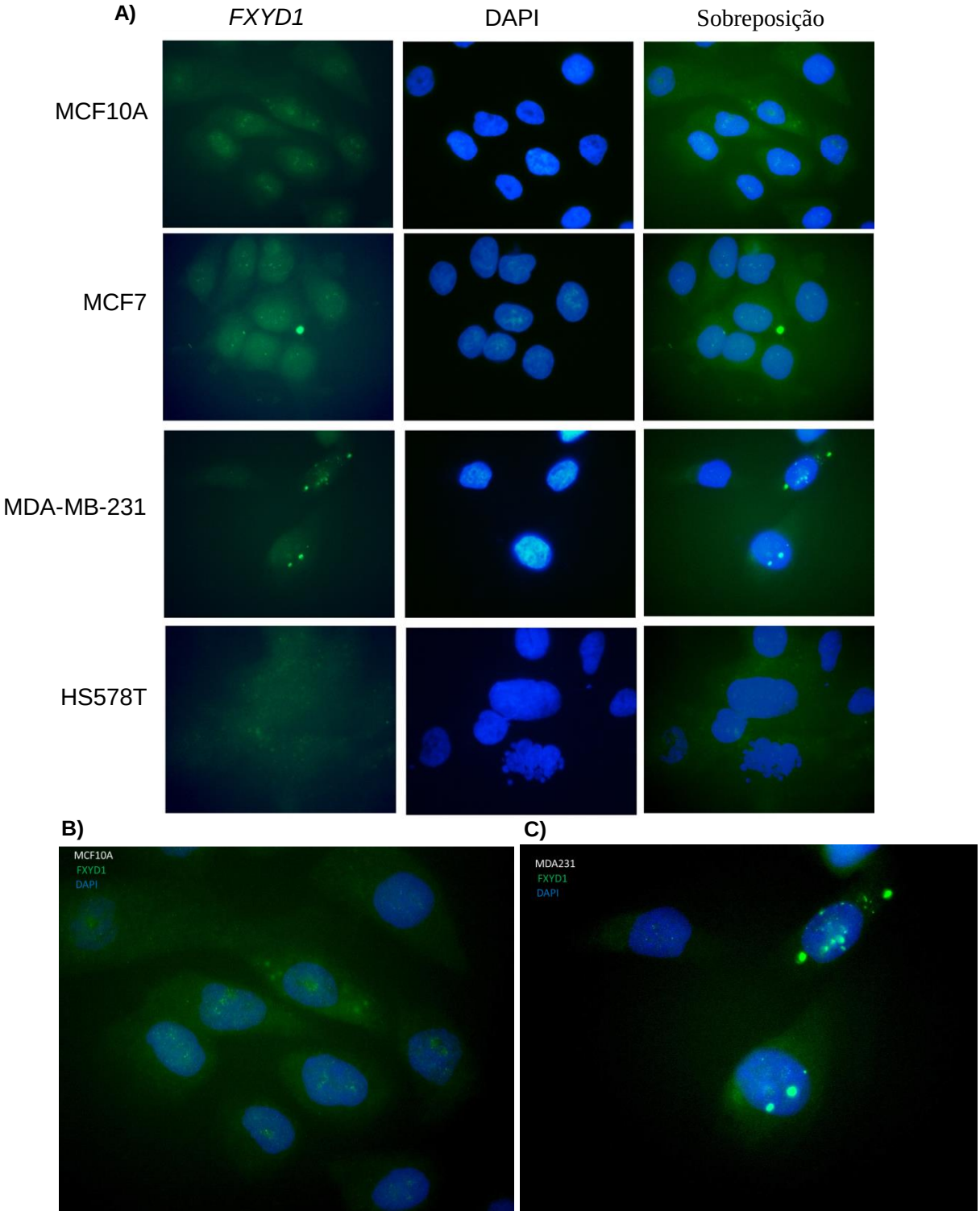
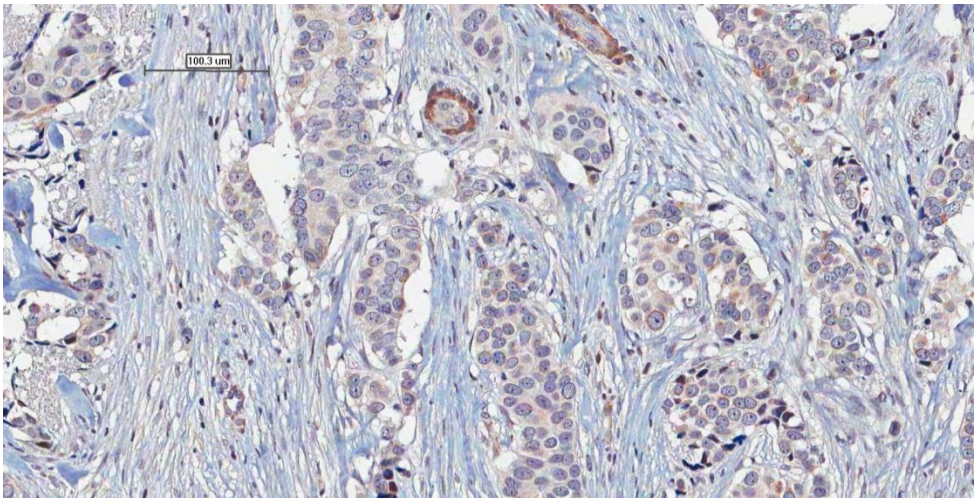
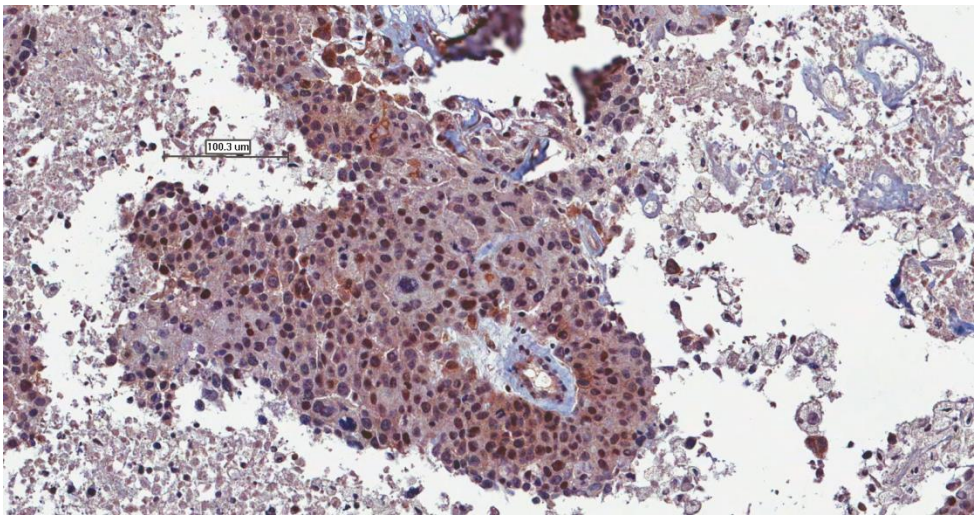


Figura S21. . Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-FXYD1 nas linhagens celulares. Em **A**, o painel mostra as imagens de imunofluorescência contra FXYD1 nas 4 linhagens testadas. É possível visualizar pequenas aglomerações nucleares em todas as linhagens testadas, além de uma fraca e difusa marcação pelo citoplasma. Na linhagem MDA-MB-231 houve uma maior aglomeração no citoplasma, num aspecto que lembra vesículas. Em **B** e **C**, podem ser comparadas as linhagens MCF10A e MDA-MB-231 , respectivamente, numa imagem ampliada.

A)



B)



C)

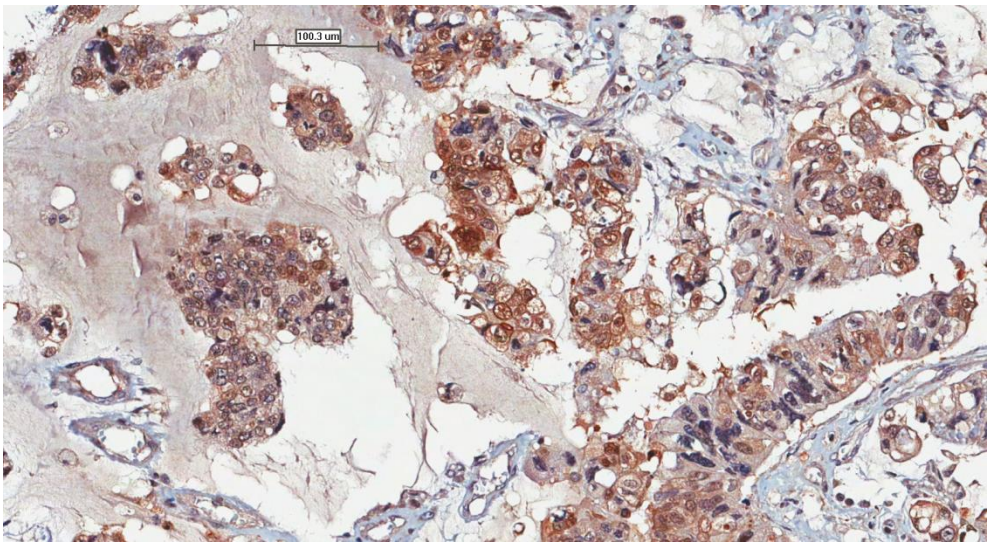


Figura S22. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de carcinoma mamário corados por imunohistoquímica para FXYD1 em amostras de câncer de mama. A) Fotomicrografia demonstrando a detecção imunohiatoquímica de FXYD1, que neste caso mostrou tênue marcação citoplasmática. A positividade encontrada foi de 0,11. **B)** Neste caso, a intensidade de marcação imunohistoquímica foi maior que a anterior, e portanto, reflete a maior abundância da proteína FXYD1. A positividade encontrada foi de 0,58. **C)** Os grupamentos celulares mostrados nesta Fotomicrografia, da mesma forma que

os anteriores, mostram a localização citoplasmática de FXYD1. Entretanto, há uma maior presença de vacúolos citoplasmáticos, acompanhados de uma deposição irregular de DAB, que aparenta maior granulação de FXYD1. Este padrão assemelha-se ao encontrado na linhagem celular metastática MDA-MB-231 (Figura S21c).

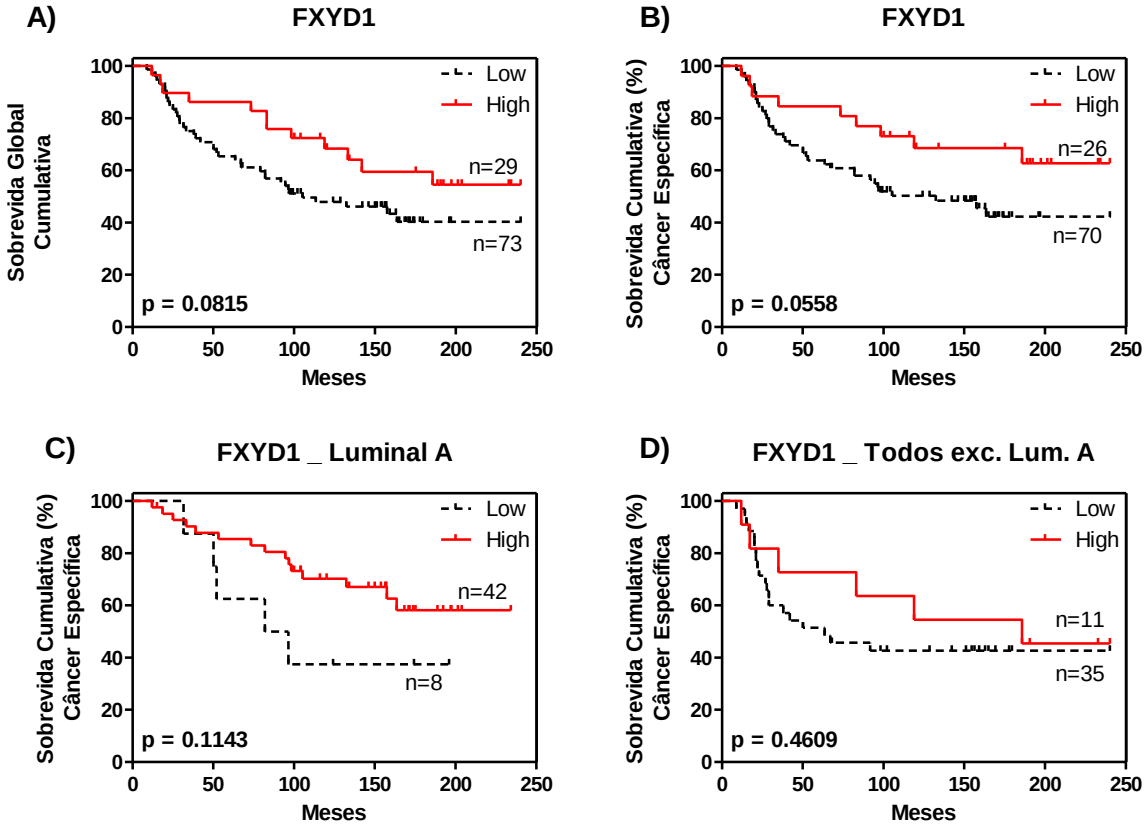


Figura S23: Análise da sobrevida dos pacientes em função da imunomarcação de FXYD1. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostra a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama (Valor de corte de positividade: 0,20). Foram considerados todos os subtipos tumorais da coorte estudada. **B)** Sobrevida câncer específica. (Valor de corte de positividade: 0,20). **C)** Sobrevida câncer específica considerando apenas os pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,02). **D)** Sobrevida câncer específica considerando todos os pacientes, exceto aqueles do subtipo luminal A. (Valor de corte de positividade: 0,20).

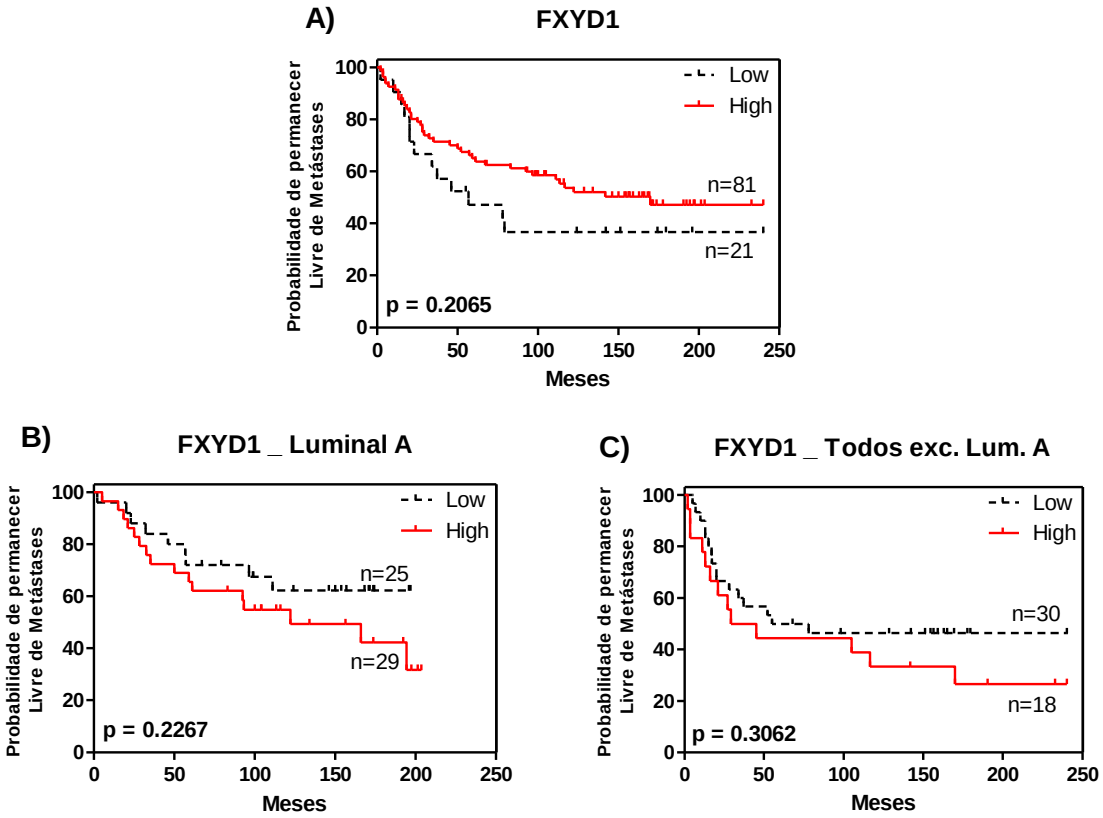


Figura S24: Sobrevida livre de metastáses em função da expressão de FXYD1. A) Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando a chance de desenvolvimento de metástase de acordo com a positividade de FXYD1 (Valor de corte de positividade: 0,02). **B)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em pacientes do subtipo luminal A (Valor de corte de positividade: 0,08). **C)** Probabilidade de desenvolvimento de metástases em todos os pacientes, exceto luminal A (Valor de corte de positividade: 0,15).

ARPC3

Os complexos protéicos Arp2/3 têm sido implicados no controle da polimerização de actina de células. O complexo humano é constituído de sete subunidades: ARP2 (ACTR2) e ARP3 (ACTR3) relacionadas à actina, e as demais ARC41 (ARPC1B), ARC34 (ARPC2), ARC21 (ARPC3), ARC20 (ARPC4), e ARC16 (ARPC5) (ARP, do Inglês: *Actin Related Protein*), cujos domínios foram conservados através da evolução (Welch et al. 1997). Tais proteínas desempenham um papel regulador na remodelagem do citoesqueleto de actina inerente ao processo de migração celular (Machesky et al. 1997). Sabe-se, que durante a transição epitélio-mesenquimal que ocorre em metástases, mudanças no padrão de citoesqueleto celular são observadas. Rauhala e colaboradores demonstraram que o silenciamento de ARP 2/3 reflete negativamente na migração de células tumorais pancreáticas (Rauhala et al. 2013).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Otto Luiz Dutra Cerqueira

Local e data de nascimento: 31/03/1975 - Brasília/DF

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Centro Educacional Charles Darwin

Cidade: Vila Velha, ES em 1992.

Graduação em Farmácia.

Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP.

Ouro Preto, Brasil.

1993 – 1998

Especialização em Citologia Clínica.

Atualiza Associação Cultural, ATUALIZA

Título: "Proporção de Mulheres Brancas e Negras Atendidas no Ano de 2002 pelo Programa Viva Mulher no Município de Paulo Afonso, Portadoras de Lesões no Colo Uterino."

Orientador: Guido Rummler

Salvador, Ba

Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia).

ICB2, Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Título: "Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteina E7 do vírus do papiloma humano tipo 16 geneticamente fusionada à flagelina FliCd de *Salmonella enterica sv. Muenchen"*

Ano de obtenção: 2009

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira

Áreas do conhecimento : Imunologia, Microbiologia, Genética

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2010 Curso de curta duração em Congelamento de oócitos e embriões - Vitrfificação. Fertitech, FERTITECH, Belo Horizonte, MG

2007 Curso de curta duração em Imunologia do Câncer.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, SP

2005 Curso de curta duração em Curso de biossegurança.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil,

2003 Curso de curta duração em EMPRETEC.
Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas da Bahia, SEBRAE/BA, Salvador

2002 Curso de curta duração em Montagem, Adm. e Habilitação. Técnica em. Farmácia Manipulação. Racine, RACINE, São Paulo, SP

1999 - 2000 Curso teórico-prático de Citopatologia Ginecológica.
Associação Baiana de Farmacêuticos Citologistas Clínicos, ABFCC, Salvador, BA

1999 Curso de curta duração em Treinamento Básico em Hemoterapia.
Fundação Hemocentro da Bahia, HEMOBA, Salvador, BA

1997 Curso de curta duração em Qualidade Total.
Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, MG

1996 Curso de curta duração em Farmacologia do sistema nervoso autônomo.
Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto MG

1996 Curso de curta duração em Análise e Interpretação de Líquor e Liquidos. Cavitários, Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, MG

1995 Curso de curta duração em Introdução à Engenharia. Genética de Microorganismos..Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, MG

1990 Curso de curta duração em Metodologia do desenvolvimento intelectual.
Intelectom, INTELECTOM, Vila Velha, ES

OCUPAÇÃO

1. Hospital de Paulo Afonso – HPA de 1998 a 2003

Vínculo institucional: *Farmacêutico-Bioquímico Responsável*

Laboratório de Análises Clínicas de referida unidade hospitalar

Cidade: Paulo Afonso, BA

2. Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo – USP de 2005 a 2009

Vínculo: Mestrando , Enquadramento funcional: Aluno de pós graduação

Regime: Dedicação exclusiva

Bolsista: CAPES

Descrição: Estudo visando entender o potencial imunomodulador da flagelina FliCd frente a imunoterapia de tumores associados ao HPV.

Situação: Concluído

Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Otto Luiz Dutra Cerqueira; Luís Carlos de Souza Ferreira (Responsável)

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

3. Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP de 2009 a 2010.

Vínculo: Doutorando, Enquadramento funcional: Aluno de pós graduação.

Regime: Dedicação exclusiva

Bolsista: CAPES

Projeto: O papel de maspina na formação da estrutura epitelial e na transição epitélio-mesenquimal.

Descrição: O projeto propôs-se investigar o papel de maspina na formação e manutenção da polaridade da célula e na transição epitélio-mesenquimal. Para tanto estas células serão cultivadas em condições em que a arquitetura fundamental é recapitulada: em transw ells e em meio tridimensional.

Situação: Desativado antes da conclusão. Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Otto Luiz Dutra Cerqueira; Nathalie Cella (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP e CAPES

4. Cancer Research Institute, Queen's University, Kingston, ON, Canada. De 2012 a 2013.

Vínculo: Doutorado Sanduiche. Enquadramento funcional: *PhD student*..

Regime: Dedicação exclusiva

Bolsista: CAPES – Programa de doutorado sanduiche no exterior (PDSE)

Linha de pesquisa: Caracterização funcional da proteína F-BAR: CIP4.

Descrição: A proteína CIP4 foi silenciada por RNAi e o fenótipo resultante foi caracterizado quanto suas capacidades migratória, invasivas e de geração de metástases *in vivo*. As vias de transdução de sinal bioquímico foram investigadas para checar qual a influência de CIP4 no processo de transição epitélio-mesenquima, bem como na capacidade de degradação da matriz extracelular. .

Situação: Concluído. Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Otto Luiz Dutra Cerqueira; Eduardo M. Reis, Andrew Craig (Responsável)

Financiador(es): CAPES e agências de fomento Canadenses.

5. Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP de 2010 até o presente.

Vínculo: Doutorando, Enquadramento funcional: Aluno de pós graduação.

Regime: Dedicação exclusiva

Bolsista: CAPES

Linha de pesquisa: Identificação de marcadores moleculares em câncer de mama

Descrição: Vide tese apresentada acima.

Situação: Em fase de conclusão. Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Otto Luiz Dutra Cerqueira; Fernando Augusto Soares, Cynthia A. Toledo, Eduardo M. Reis (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP e CAPES

PRODUÇÃO

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)
1. CERQUEIRA, O. L. D., Longhi, MT, Alves, MJM, Cella, N
Maspin is essential for mammary acini morphogenesis in three-dimensional culture
XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society - SBBq, 2010, Foz do Iguaçu.
Livro de resumos. São Paulo: SBBq, 2010. v.1. p.81 – 81

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CERQUEIRA, O. L. D., Alves, MJM, Cella, N
Maspin is Essential for Mammary Acini Morphogenesis in Three-dimensional Culture.
II Encontro da pós-graduação do Instituto de Química, 2010, São Paulo.

2. CERQUEIRA, O. L. D., Bibancos M, PROCHIA, B. F. M. M., DINIZ, M. O., FERREIRA, L. Caracterização de in vitro de vacinas de DNA capazes de expressar a oncoproteina E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à flagelina FliCd de Salmonella enterica sv. Muenchen. 54° Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.
Livro de resumos. Sao Paulo: SBG, 2008. v.1. p.GH338 - GH338

3. CERQUEIRA, O. L. D., PROCHIA, B. F. M. M., DINIZ, M. O., FERREIRA, L. C. S.
Characterization of a DNA vaccine encoding the HPV-16 E7 oncoprotein genetically fused to the N-terminal domain of Salmonella enterica sv Muenchen FliCd flagellin.
XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology, 2008, Ribeirão Preto.
Livro de resumos. São Paulo: Brazilian Society for Immunology, 2008. v.1. p.35 - 35

4. Bibancos M, CERQUEIRA, O. L. D., Szulczew ski, V, Cianciarullo, A, FERREIRA, L. C. S.
Construção de vacinas de DNA capazes de expressar a oncoproteína E7 do vírus Papiloma humano tipo 16 (HPV-16) geneticamente fusionada à flagelina FliCd de Salmonella enterica sv. Muenchen.
II Seminário latino-americano de tecnologia de cultivos celulares, 2006, São Paulo.
Livro de resumos. São Paulo: II Seminário latino-americano de tecnologia de cultivos celulares, 2006.v.1. p.10 – 10

5. Bibancos M, PROCHIA, B. F. M. M., CERQUEIRA, O. L. D., Szulczew ski, V, Cianciarullo, A, FERREIRA, L. C.S.Expressão de uma subunidade da oncoproteína E7 do vírus do papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e produção de anticorpos policlonais específicos. In: 52° Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu.
Livro de resumos. Sao Paulo: SBG, 2006. v.1. p.gm189 - gm189

6. Bibancos M, DINIZ, M. O., MASSIS, L. M., CERQUEIRA, O. L. D., LASARO, M. O., FERREIRA, L. C. S.Construction of vaccine vectors expressing the HPV-16 oncoprotein genetically fused to the Salmonella FliCd flagellin
XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.
Livro de resumos. Sãp Paulo: Sociedade Bbrasileira de Microbiologia, 2005. v.1. p.11 – 11

Apresentação de trabalho e palestra

1. CERQUEIRA, O. L. D., Longhi, MT, Alves, MJM, Cella, N
Maspin is Essential for Mammary Acini Morphogenesis in Three-dimensional Culture., 2010.
(Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. CERQUEIRA, O. L. D., FERREIRA, L. C. S.
Avaliação de um sistema de imunização tipo sensibilização-reforço empregando a oncoproteína E7 do HPV, geneticamente fusionada à Flagelina FliCd de Salmonella enterica.,2007. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

Demais produções bibliográficas

1. CERQUEIRA, O. L. D., Luciana Coutinho, Bayardo, T.B.
Cultivos celulares em ambiente tridimensional como ferramenta de estudo de neoplasias mamárias humanas..
Apostila do curso de verão do Departamento de Bioquímica 2011.
São Paulo - SP: Departamento de Bioquímica - Instituto de Química, 2011.
Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Bioquímica,Biologia Celular

Produção técnica
Demais produções técnicas
1. CERQUEIRA, O. L. D., Luciana Coutinho, Bayardo, T.B.
Curso de verão - Tópicos em Bioquímica e Biologia Molecular, 2010.
Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado.
Áreas do conhecimento: Bioquímica,Biologia Molecular,Biologia Celular.

Idiomas
Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

2010 Mellhor poster apresentado _ Sbbq Award, XXXIX Annual Meeting of the Brazillian Biochemistry and Molecular Biology Society _ SBBQ