Fabiana Baroni Alves Makdissi

**Análise da expressão de E-caderina, Snail e
Hakai em células epiteliais de tumor e tecido
peritumoral de mulheres com carcinoma ductal
invasivo da mama: correlação com
comprometimento linfonodal**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Prof. Dra Maria
Aparecida Azevedo Koike Folgueira**

**São Paulo
2006**

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Fábio, presente de Deus em minha vida. Razão da minha felicidade diária, da minha garra e do meu gosto por viver. Pessoa que respeito, ouço, admiro e amo de todo meu coração e toda a minha alma.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Ary e Cleodete, por tudo que sou... Pela vida que me proporcionaram; pelo amor incondicional e pelo sacrifício por uma educação privilegiada que me permitiu alçar vôo e chegar até aqui...

Ao meu irmão Ary Jr., minha cunhada Andressa e meu querido sobrinho Guilherme, pela amizade e pela presença constante ao lado dos meus pais, o que permite diminuir a dor da distância.

À minha família Makdissi, pelo amor e grata “adoção”, presença deliciosa e indispensável em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Aparecida Koike Folgueira, minha orientadora, exemplo a ser seguido como médica e pesquisadora, por sua impressionante capacidade de trabalho e clareza de raciocínio. Pelo apoio e conselhos sempre sábios, não apenas para a realização deste trabalho e de meu progresso profissional, mas também para a minha vida pessoal.

Ao Doutor. Mário Mourão Netto, por seu exemplo de liderança e de chefia, dedicação médica e busca incessante por novos conhecimentos. Pela confiança e aposta em meu futuro profissional.

À Professora Doutora. Maria Mitzi Brentani, por sua constante e incansável busca do desenvolvimento científico, brilhante exemplo de dedicação aos ideais universitários.

A Tician Benvenuti, minha amiga, exemplo de competência profissional, pela dedicação e imprescindível e valoroso auxílio na elaboração deste trabalho.

À Lúcia Valéria Machado, pelo auxílio e atenção disponibilizados na elaboração deste trabalho.

Às colegas do laboratório de pesquisa do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da USP, particularmente à **Lúcia Katayama** pelo apoio oferecido na elaboração desta tese.

À Cíntia Milani, pelo apoio e colaboração nas fases iniciais deste trabalho, que foram de grande importância para a conclusão do mesmo.

Aos colegas do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer representado aqui por Doutor. Eduardo Lyra, pela colaboração e participação na realização deste trabalho.

Aos Doutores Juan Bautista Donoso Collins, Maria do Socorro Maciel, Carlos Eduardo Martins Fontes, Hirofumi Iyeyasu e Solange Maria Torchia Carvalho, meus colegas no Departamento de Mastologia do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo companheirismo nas atividades quotidianas, pelos ensinamentos e pela grata convivência.

A todo o Departamento de Anatomia Patológica (médicos e técnicos) neste trabalho particularmente representado pela Doutora Cíntia Osório e Dr. Fernando Soares, sempre muito prestativos e acessíveis, por suas críticas e sua colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Anestesia do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo grato auxílio na realização deste trabalho.

Aos médicos residentes do Hospital do Câncer de São Paulo, pela atenção e empenho nas coletas dos materiais.

À amiga Suely, da biblioteca do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo carinho e indispensável auxílio nas revisões, pesquisas e orientações práticas na realização deste trabalho.

À secretária Elizângela do Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, pela amizade e profissionalismo impecável que muito me auxiliou na elaboração deste trabalho.

Às secretárias Érika, Eliane, Ednéia e Adalquíria, pelo auxílio e apoio constantes.

Às Instrumentadoras Cirúrgicas Valéria, Regina e Eliane, pela capacidade profissional e ajuda contínua.

À FAPESP e CAPES pelo financiamento do trabalho.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vinhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	8
3.1	Casuística.....	8
3.2	Características das pacientes e dos tumores.....	8
4	MÉTODOS.....	11
4.1	Coleta e Transporte das Amostras.....	11
4.2	Enriquecimento de Células Epiteliais de Tumor Primário Através de Método Imunomagnético.....	12
4.3	Imunocitoquímica de Células Recuperadas com o Anticorpo BER- EP4.....	13
4.4	Extração de RNA Total das Células Epiteliais.....	16
4.5	Reação de Transcriptase Reversa (RT) para Obtenção do cDNA.....	17
4.6	Elaboração dos Primers e Padronização das Reações de RT-PCR..	18
4.7	Padronização do Método de RT-PCR.....	20
4.8	RT-PCR em Tempo Real.....	24
4.9	Padronização das Condições da Reação de RT-PCR Quantitativa..	28
4.10	Análise Estatística.....	31

5	RESULTADOS.....	32
5.1	Expressão de E-caderina.....	32
5.2	Expressão de Snail.....	34
5.3	Expressão de Hakai.....	36
5.4	Correlação entre a expressão de E-caderina, Snail e Hakai em amostras de câncer de mama.....	38
5.5	Expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de amostras de tecido tumoral de acordo com o comprometimento linfonodal.....	43
5.6	Expressão E-caderina, Snail e Hakai em Células Epiteliais de Amostras de Tecido Tumoral de Acordo com o Status de Receptores ER, PR e c-Erb 2.....	45
5.7	Expressão de E-caderina, Snail e Hakai em Células Epiteliais de Amostras de Tecido Tumoral de Acordo com o Tamanho do Tumor e Estadiamento Clínico-Patológico.....	47
5.8	Expressão de E-caderina, Snail e Hakai em Células Epiteliais de Amostras de Tecido Tumoral de Acordo com o Status Menopausal..	48
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÕES.....	55
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

Lista de Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
Ber-EP4	partícula magnética
c-Erb B2	receptor de membrana Erb-B2
cDNA	DNA complementar
CK19	citoqueratina 19
Ct	ciclo limiar
DEPEC	dietildicarbonato
DMEM	meio Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetil-sulfóxido
dNTP	desoxiribonucleotídeos
DTT	ditiotreitól
E1	enzima ativadora de ubiquitina
E2	enzima conjugadora de ubiquitina
E3	ubiquitina ligase
ER	receptor de estrógeno
GIBCO	soro de bezerro
GH	grau histológico
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
M	molar
MEC	matriz extra celular
mg	miligrama
ml	mililitro
μl	microlitros
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
pb	pares de bases
PBS	tampão de salina fosfato
PBS	BSA - tampão de salina fosfato e soro albumina bovina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PR	receptor de progesterona
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	enzima Transcriptase Reversa
SBR	grau histológico (Scarff, Bloom e Richardson)
T.A.	temperatura ambiente
TEM	transição epitélio mesênquima
TNM	Classificação de tumores malignos
<i>T_m</i>	temperatura de desnaturação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração gráfica das etapas da teoria transição epitélio-mesênquima em câncer de mama.....	4
Figura 2 - Separação de células epiteliais utilizando anticorpo específico ligado à partícula magnética.....	13
Figura 3 - Expressão imunocitoquímica de citoqueratina 19 (CK19) em células MCF-7 recuperadas com anticorpo Ber-EP4 após separação Imunomagnética.....	16
Figura 4 - Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de β -actina em linhagens celulares e fibroblastos.....	21
Figura 5 - Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de E-caderina em linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos.....	22
Figura 6 - Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de Snail em linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos.....	23
Figura 7 - Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de Hakai em linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos.....	24
Figura 8 - Curva de quantificação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real do gene da SNAIL com linhagens celulares epiteliais e hematopoiéticas.....	30
Figura 9 - Curva de desnaturação por RT-PCR em tempo real do gene da Snail com linhagens celulares epiteliais e hematopoiética.....	30
Figura 10 - Distribuição dos valores de expressão de E-caderina nas amostras de células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral.....	33
Figura 11 - Correlação entre a expressão de E-caderina nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral.....	34
Figura 12 - Distribuição dos valores de expressão de Snail nas amostras de células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral.....	35
Figura 13 - Ilustração da correlação entre a expressão de Snail nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral.....	36
Figura 14 - Distribuição dos valores de expressão de Hakai nas amostras de células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral.....	37

Figura 15 - Correlação entre a expressão de Hakai nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral.....	38
Figura 16 - Correlação entre a expressão de Snail e E-caderina nas células epiteliais de tumor.....	39
Figura 17 - Correlação entre a expressão de Hakai e E-caderina nas células epiteliais de tumor.....	40
Figura 18 - Correlação entre a expressão de Snail nas células epiteliais de tumor e Hakai nas células epiteliais de tumor.....	40
Figura 19 - Correlação entre a expressão de Hakai nas células epiteliais peritumorais e E-caderina nas células epiteliais peritumorais.....	41
Figura 20 - Correlação entre a expressão de Hakai nas células epiteliais peritumorais e Snail nas células epiteliais peritumorais.....	42
Figura 21 - Correlação entre a expressão de E-caderina nas células epiteliais peritumorais e Snail nas células epiteliais peritumorais.....	42
Figura 22 - Expressão de E-caderina nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes sem e com comprometimento axilar.....	44
Figura 23 - Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes sem e com comprometimento axilar.....	44
Figura 24 - Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes sem e com comprometimento axilar.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das pacientes e dos tumores.....	10
Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.....	19
Tabela 3 - Características dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados.....	19
Tabela 4 - Condições de temperatura determinadas para realização da RT- PCR em tempo real. AQUEC. INICIAL = aquecimento inicial.....	20
Tabela 5 - Expressão da E-caderina em células epiteliais, fibroblastos e linfócitos....	22
Tabela 6 - Expressão da Snail em células epiteliais, fibroblastos e linfócitos.....	23
Tabela 7 - Expressão da Hakai em células epiteliais, fibroblastos e linfócitos.....	23
Tabela 8 - Condições da RT-PCR em tempo real.....	29
Tabela 9 - Expressão de E-caderina nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama.....	32
Tabela 10 - Expressão de E-caderina nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral correspondente de pacientes com carcinoma ductal de mama.....	33
Tabela 11 - Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral de peritumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama.....	35
Tabela 12 - Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral correspondente de pacientes com carcinoma ductal de mama.....	36
Tabela 13 - Expressão de Hakai nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama...	
Tabela 14 - Expressão de Hakail nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral correspondente de pacientes com carcinoma ductal de mama.....	38
Tabela 15 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama sem e com comprometimento axilar.....	43
Tabela 16 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com receptor de estrógeno positivo e negativo com carcinoma ductal de mama.....	46
Tabela 17 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de	

tecido tumoral de pacientes com receptor de progesterona positivo e negativo com carcinoma ductal de mama.....	46
Tabela 18 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com expressão de c-Erb B2 (2 ou 3+) e negativo com carcinoma ductal de mama.....	46
Tabela 19 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com tumores de até 2,0cm e tumores maiores 2,0cm com carcinoma ductal de mama.....	47
Tabela 20 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com estadiamento clínico-patológico I, II ou III com carcinoma ductal de mama.....	47
Tabela 21 - Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes em pré e pós menopausa com câncer de mama.....	48

RESUMO

Makdissi FBA. **Análise da expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de tumor e tecido peritumoral de mulheres com carcinoma ductal invasivo da mama: correlação com comprometimento linfonodal.** [Dissertação]. São Paulo; 2006. [Universidade de São Paulo].

Para invadir, as células do câncer da mama reduzem sua adesão celular e adquirem mobilidade e atividades proteolíticas adquirindo características mesenquimais em um processo similar ao que ocorre na transição epitélio-mesênquima da fase embrionária. A E-caderina é a principal molécula de adesão célula-célula e defeitos relacionados à sua função são descritos em carcinomas da mama. A expressão de E-caderina é modulada por alguns fatores transcricionais, dentre eles o Snail. A inativação da E-caderina também pode ser atribuída à sua internalização e degradação através do sistema de proteassoma mediado pelo Hakai, uma E3 ubiquitina ligase. Nosso objetivo foi determinar a expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais obtidas de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama e determinar se sua expressão se correlacionava ao grau de comprometimento linfonodal axilar. Pacientes foram prospectivamente selecionadas de dois centros de tratamento de câncer em São Paulo, Brasil, Hospital do Câncer A C Camargo e Instituto Brasileiro de Controle do Câncer IBCC, de dezembro de 2003 a novembro de 2005. Amostras de 45 pacientes com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma ductal invasivo foram coletadas durante cirurgia. A idade mediana foi de 53 anos (33-91). Tumores em estadiamento precoce foram identificados em 75% das pacientes (I/II) e 52,3% das pacientes apresentavam comprometimento linfonodal axilar. O tecido foi degradado mecânica e enzimaticamente e células epiteliais foram recuperadas através de anticorpo contra antígeno de membrana ligado a partícula magnética. O RNA foi extraído através do método quantitativo de RT-PCR utilizando-se

“primers” específicos para E-caderina, Snail e Hakai. Nenhuma variação na expressão de E-caderina, Snail ou Hakai foi identificada entre as amostras de tecido tumoral e peritumoral. A expressão das três moléculas foi similar nas células epiteliais de amostras de tumor de pacientes com e sem comprometimento linfonodal axilar. E ainda a expressão de E-caderina, Snail e Hakai não variou de acordo com o status menopausal, a expressão de receptores de estrógeno ou progesterona, o status do c-Erb B2, ou o estadiamento clínico-patológico do tumor. Em carcinoma ductal invasivo da mama, a expressão de E-caderina, Snail e Hakai, obtida da célula epitelial de tecido tumoral e peritumoral parecem semelhantes. Nossos dados indicam que estas moléculas não podem ser utilizadas como marcadores de metástase linfonodal neste tipo tumoral.

Descritores: neoplasias mamárias, expressão gênica, carcinoma ductal de mama, células epiteliais, linfonodos, mulheres.

SUMMARY

Makdissi FBA. **E-cadherin, Snail and Hakai mRNA expression in epithelial cells from tumoral and peritumoral tissue from women with breast invasive ductal carcinoma: correlation with axillary's lymph node involvement.** [Dissertação]. São Paulo; 2006. [Universidade de São Paulo].

To invade, breast cancer cells reduce their intercellular cohesion, enhance their motility and proteolytic activity, and acquire mesenchymal cell characteristics, in a process similar to epithelial-mesenchymal transition, that takes place during embryogenesis. E-cadherin is the main molecule of cell-cell adhesion and defects on its function was described in carcinomas. E-cadherin expression is modulated by some transcriptional factors, among them, Snail, which may repress its transcription. E-cadherin inactivation may also be attributed to it's internalization and degradation through the proteasome mediated by Hakai, an E3 ubiquitin ligase. Our aim was to determine in epithelial cells, obtained from the tumor itself and its adjacent tissue, exclusively from invasive ductal breast carcinoma patients the expression of E-cadherin, Snail and Hakai, and whether these transcripts are correlated with the axillary's lymph node involvement. Patients were prospectively accrued in two reference centers for cancer treatment in São Paulo, Brazil: Hospital do Cancer A. C. Camargo and Instituto Brasileiro de Controle do Cancer, from December 2003 to November 2005. Samples from 45 breast cancer patients with histopathologically confirmed invasive ductal carcinoma were collected during surgery. Median age was 53 (33-91) years. Early breast cancer (stages I/II) was detected in 75% of the patients and lymph node involvement was present in 52,3% of them. Tissue was minced and epithelial cells were recovered using an immunomagnetic antibody against an epithelial membrane antigen. RNA was extracted and quantitative RT-PCR was performed using specific primers for E-cadherin, Snail and Hakai. No variations in expression of E-cadherin, Snail and Hakai mRNA

were observed between epithelial cells of tumoral and peritumoral samples. Expression of the three molecules was similar in epithelial cells of tumor samples with or without axillary's lymph node involvement. In addition, expression of E-cadherin, Snail and Hakai did not vary according to menopausal status, ER and PR immunoexpression, HER2 status or pathological clinical stage. In breast invasive ductal carcinomas , expression of E-cadherin, Snail and Hakai, in epithelial cells obtained from tumor and peritumoral tissues seems similar. Our data indicate these molecules may not be used as lymph node metastasis markers in patients with invasive ductal carcinomas.

Descriptors: Breast neoplasms, gene expression, carcinoma ductal breast, epithelial cells, lymph nodes, women.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema de saúde pública no mundo todo, sendo a primeira causa de morte por câncer nas mulheres mesmo em países desenvolvidos. A estimativa para o Brasil em 2006 é de 48.930 novos casos, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2006).

A mama é formada por um parênquima constituído por ácinos e ductos lactíferos envoltos por tecido adiposo mantido por um estroma conjuntivo (Cotran et al., 1999). Este macroambiente orienta as células epiteliais a se estabelecerem nas extremidades apical e basal, numa superfície intacta e polarizada que mantém o seu estado diferenciado, sendo o contato físico adquirido através da combinação de diversas junções (Bissel e Radisky, 2001; Bissel et al., 2002).

O câncer da mama é uma doença resultante de um processo de múltiplos passos, no qual uma série de alterações genéticas ocorre em seqüência, levando as células a perderem seu controle no crescimento (Farber, 1984). Uma das hipóteses é de que tais alterações modificam as células normais que sucessivamente transformam-se em células hiperplásicas, que por sua vez adquirem atipias, a seguir transforma-se em carcinoma in situ e finalmente carcinoma invasor (Beckmann et al., 1997; Porter et al., 2001).

Ao diagnóstico do câncer de mama vários parâmetros clínico-patológicos auxiliam na análise do prognóstico e nas melhores opções de tratamento para o paciente. Dentre eles se encontram; tamanho do tumor, comprometimento axilar, grau histopatológico, estado dos receptores hormonais e de expressão de moléculas de membrana como c-Erb B2. Destes, talvez o mais importante fator prognóstico seja o comprometimento linfonodal (Fisher et al., 1983), ou seja, quanto maior o número de linfonodos comprometidos por neoplasia pior é taxa de sobrevida destes pacientes. Porém a história natural do câncer de mama é caracterizada por sua heterogeneidade entre os pacientes e tumores, com similares diagnósticos histopatológicos podendo apresentar cursos clínicos e respostas variadas ao mesmo tipo de tratamento (Osborne et al., 2004). Sabe-se, por exemplo, que 15 a 20% dos pacientes sem comprometimento axilar por tumor, que deveriam apresentar bom prognóstico evoluem com metástase sistêmica no seu seguimento (Stathopoulou et al., 2002) e a despeito do tratamento um quarto dos pacientes com carcinoma invasor morrem pela doença (Porter et al., 2001).

O processo de metástase ocorre também em várias etapas. O primeiro passo é a perda da adesão célula-célula e o ganho de mobilidade que permite à célula invadir o tecido adjacente. O segundo passo ocorre quando a célula tumoral penetra através do endotélio do vaso sanguíneo ou do ducto linfático e entra no sistema circulatório. Somente algumas células são capazes de sobreviver a este processo e completam o processo de

metastatização saindo do sistema circulatório, depositando-se em outro sítio e proliferando-se a seguir (Yang et al., 2004).

Inúmeros trabalhos são realizados na tentativa de se identificar outros fatores responsáveis pela diferença de comportamento e pelo processo de metastatização dos tumores e atualmente a ênfase tem sido dada aos estudos que procuram compreender a progressão tumoral através das alterações moleculares. Os tumores são considerados como resultado de acúmulo de processos múltiplos nos genes que regulam o crescimento da célula e sua diferenciação (Beckmann et al., 1997; Shackney e Silverman, 2003), portanto, através da análise da expressão gênica dos tumores a chave da tumorigênese pode ser descoberta, e novos alvos de prevenção e tratamento podem surgir. Baseado nos diferentes fenótipos e evoluções sugeridos para a progressão do câncer de mama é o processo de transição epitélio-mesênquima que tem sido sugerido como o principal responsável (Porter et al., 2001, Thiery, 2002, Kang e Massague, 2004; Yang et al., 2004).

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo fundamental e altamente conservado que governa a morfogênese de organismos multicelulares, principalmente durante o desenvolvimento embrionário. Nele um epitélio primitivo origina células mesenquimais com uma morfologia apropriada para a migração (Thiery, 2002; Lee et al., 2006). *In vitro*, o critério para a definição de TEM envolve a perda da polaridade celular, a separação em células individuais e uma subsequente dispersão após a aquisição da mobilidade. Depois da perda da polaridade celular, o citoesqueleto é

remodelado, há uma mudança do filamento intermediário de citoqueratina para vimentina que passa a ser um importante marcador (Vincent-Salomon e Thiery, 2003).

Na mama, assim como no modelo embrionário, a transição epitélio-mesênquima ocorre quando as células epiteliais perdem sua polaridade e seu contato célula-célula, modificam drasticamente seu citoesqueleto, desenvolvem componentes mesenquimais e manifestam fenótipo migratório (Figura 1).

Fonte: Thiery (2002)

Figura 1. Ilustração gráfica das etapas da teoria transição epitélio-mesênquima em câncer de mama

Um dos melhores marcadores moleculares do processo de TEM no carcinoma de mama é a perda da expressão da E-caderina, uma moléculas

de adesão cálcio-dependente, relacionada com a adesão célula-célula nos tecidos epiteliais (Raw e Ho, 2000; Shackney e Silverman, 2003; Caldeira et al., 2006). Sua expressão é controlada, em parte, por membros da família do Snail e do SIP 1 (Thiery, 2002; Lee et al., 2006). Este processo de transição tem sido reconhecido como um potente mecanismo para a progressão de carcinomas já que diversas vias de sinalização da transição epitélio mesênquima também são comuns à progressão tumoral (Thiery, 2002; Friedl e Wolf, 2003) e pouco se sabe sobre sua atuação no tipo histológico de carcinoma mais freqüente na população feminina, o carcinoma ductal invasivo.

Vários repressores transcricionais de E-caderina, isolados recentemente, incluem moléculas que apresentam dedos de zinco, tais como, Snail, Slug, ZEB1 e ZEB 2 (Peinado et al., 2003). Durante a transição epitélio-mesênquima acontece a ativação patológica do fator transcricional Snail (família de fatores de transcrição dedos de zinco) (Cano et al., 2000), o qual age como repressor transcricional da expressão de E-caderina e também de MUC1 e citoqueratina 18, que são moléculas características de tecido epitelial (Guaita et al., 2002). Além disso, em uma série de amostras de câncer de mama, a expressão de Snail foi observada em todos aqueles associados à presença de linfonodos acometidos, sugerindo que este poderia ser um marcador de potencial metastático (Blanco et al., 2002).

Outra causa de diminuição da E-caderina parece estar relacionada à sua excessiva internalização e degradação através do sistema de degradação protéica chamado ubiquitinação. Este processo inclui uma

ubiquitina, uma enzima ativadora de ubiquitina (E1), uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2), e uma ubiquitina ligase (E3) que promove a especificidade do sistema de ubiquitinação, reconhecendo o substrato através de alta especificidade de interação proteína-proteína. Segundo autores a molécula chamada Hakai funciona como uma E3 ligase que se liga à E-caderina e causa sua internalização com subsequente degradação proteica (Fujita et al. 2002). Este evento determina uma perturbação da adesão célula-célula e pode então participar da progressão tumoral e metastatização (Beckmann et al., 1997, Pece e Gutkind, 2002).

A transição epitélio-mesênquima pode estar relacionada com o processo de transformação tumoral (mama normal, carcinoma in situ, carcinoma invasor) e capacidade de metastatização. A hipótese é que células epiteliais normais ao se tornarem malignas adquiram fenótipo mesenquimal expressando moléculas de forma distinta; dando a estas células maior potencial migratório para disseminar-se para linfonodos. Logo, pretendemos separar as células epiteliais de mama tumoral e peritumoral (normal) de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama e determinar a expressão de moléculas que se correlacionem ao processo de adesão (expressão, repressão e degradação), assim como correlacionar tais resultados ao comprometimento linfonodal destas pacientes.

2 OBJETIVOS

1. Determinar a expressão de E-caderina, Snail e Hakai no componente epitelial do tumor da mama e no componente epitelial do tecido peritumoral.
2. Observar se há correlação entre a expressão de E-caderina, Snail e Hakai no componente epitelial do tumor da mama.
3. Analisar se existe variação entre a expressão de E-caderina, SNAIL e HAKAI em células epiteliais do tecido tumoral de acordo com o comprometimento linfonodal axilar e características clínico-patológicas dos tumores.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Neste estudo foram incluídas 45 pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo da mama confirmado por exame histopatológico, atendidas pelo Grupo de Mastologia do Hospital do Câncer A.C Camargo e Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) entre dezembro de 2003 e novembro de 2005. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital do Câncer A.C. Camargo, do IBCC e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A presente análise incluiu aquelas com carcinoma ductal invasivo da mama submetidas a tratamento cirúrgico inicial.

Foram excluídas pacientes com carcinoma lobular invasivo, pacientes com diagnóstico prévio de câncer invasivo da mama tratadas previamente com quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia e pacientes com carcinoma metastático.

3.2 Características das pacientes e dos tumores

Obtivemos o material de 45 pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama.

A mediana da idade foi de 53 anos, variando de 33anos a 91 anos e 33,3% (15) das pacientes encontravam-se na pré-menopausa.

Em 25% (11) das pacientes o estadiamento clínico patológico foi I, em 50% (22) II e em 25% (11) estágio III sendo que uma paciente não pôde ser devidamente estadiada, pois por motivos clínicos não foi submetida ao esvaziamento axilar. Em 42,2% das pacientes o tamanho do tumor foi menor que 2cm, em 44,4% o tamanho variou entre 2,1 e 5cm e em 13,3% foi maior que 5,1cm. Após análise histopatológica dos linfonodos observou-se que 47,7% apresentavam linfonodos livres de comprometimento tumoral e 52,3% apresentavam comprometimento (Sobin e Wittekind, 2006).

A análise histopatológica dos tumores evidenciou que 15,9% deles apresentavam-se com grau histológico (SBR) I, e 84% com graus II ou III. Em 80% dos casos o tumor expressava receptor de estrógeno, em 77,8% receptor de progesterona e em 31,8% dos casos havia hiperexpressão de c-Erb B2, (2 ou três +) (Tabela 1).

O tratamento cirúrgico realizado foi ressecção segmentar (quadrantectomia) com esvaziamento axilar em 51,1% das pacientes e mastectomia total com esvaziamento axilar em 48,9%.

Tabela 1. Características das pacientes e dos tumores

paciente	idade	pT	pN	ECP	GH	ER	PR	Erb B2	cirurgia
1	47	1	1	2	II	-	+	+	0
2	49	1	1	2	I	+	+	+	1
3	42	3	0	2	II	+	+	-	1
4	41	2	2	3	II	-	+	-	1
5	48	2	0	2	II	-	-	-	0
6	78	2	0	2	II	+	+	+	1
7	58	1	2	3	II	+	+	-	0
8	85	2	0	2	II	+	+	-	1
9	53	2	0	2	II	+	+	-	0
10	43	1	0	1	II	+	+	-	1
11	73	2	2	3	II	+	+	-	0
12	56	2	3	3	III	+	+	+	0
13	80	2			II	+	+	-	0
14	52	1	0	1	III	+	+	+	0
15	85	3	1	2	II	-	-	-	1
16	54	2	3	3	II	-	-	-	1
17	47	1	1	2	II	-	+	-	0
18	56	1	0	1	III	+	+	-	0
19	51	2	0	2	I	+	+	+	0
20	80	2	0	2	I	+	+	-	0
21	72	2	2	3	II	+	+	-	1
22	41	2	1	2	III	-	-	+	1
23	59	2	0	2	III	+	+	+	1
24	76	2	1	2	II	+	+	-	1
25	50	1	1	2	II	+	+	-	0
26	58	1	1	2	I	+	-	+	0
27	76	4	0	3	III	+	+	-	1
28	34	2	1	2	II	+	+	-	1
29	43	2	1	2	III	-	-	+	1
30	33	3	3	3	II	-	-	-	1
31	46	1	0	1	I	+	+	+	0
32	40	2	1	2	I	+	+		1
33	53	1	2	3	I	+	+	+	1
34	51	2	1	2	III	+	+	-	1
35	47	1	0	1	II	+	-	-	0
36	50	1	1	2	III	+	-	-	0
37	49	3	3	3	III	+	+	-	1
38	55	2	0	2	II	+	+	-	0
39	43	3	3	3	III	+	+	-	1
40	62	1	0	1	II	+	+	+	0
41	58	1	0	1	II	+	-	-	0
42	53	1	0	1		+	+	-	0
43	70	1	0	1	II	+	+	-	0
44	42	1	0	1	III	+	+	-	0
45	91	1	0	1	III	+	+	-	1

Legenda: pT = tamanho do tumor de acordo com resultado histopatológico (1= até 2,0cm, 2= de 2,1 a 5,0cm, 3= maior que 5,1cm, 4= com comprometimento local de pele); pN = comprometimento linfonodal de acordo com resultado histopatológico (0= ausência de linfonodos comprometidos, 1= de 1 a 3 linfonodos comprometidos, 2= de 4 a 9 linfonodos comprometidos); ER= status do receptor de estrogênio (negativo, positivo); PR= status do receptor de progesterona (negativo, positivo); GH= grau histológico de SBR (graus I, II ou III); Erb B2= status do receptor de c-Erb-B2. ((-)= ausência de amplificação, (+)= amplificação 2ou 3+); cirurgia= tipo de cirurgia a qual a paciente foi submetida (0= ressecção segmentar com esvaziamento axilar, 1= mastectomia total com esvaziamento axilar)

4 MÉTODOS

4.1 Coleta e Transporte das Amostras

As amostras de tumor primário, tecido peritumoral das pacientes foram coletadas pela equipe de Mastologistas do Hospital do Câncer de São Paulo e do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer-IBCC durante o ato cirúrgico.

A peça operatória era encaminhada para a sala de congelação constando de tumor centralizado com margem de segurança de no mínimo 2cm que circundasse a peça e na sala de congelação os patologistas destes dois centros colhiam os fragmentos através de análise macroscópica: um fragmento de tecido tumoral e outro fragmento de tecido peritumoral.

O tecido tumoral e peritumoral foram transportados separadamente em garrafas para cultura celular (Nunc – 25cm²) contendo meio “Dubelcco’s Modified Eagle Médium” (DMEM) (Sigma – Aldrich corporation – ST. Louis Missouri. E.U.A) acrescido de ampicilina (100µg/ml) (Sigma – Aldrich corporation – ST. Louis Missouri. E. U. A) e estreptomicina (100µg/ml) (Sigma – Aldrich corporation – ST. Louis Missouri. E. U. A).

4.2 Enriquecimento de Células Epiteliais de Tumor Primário Através de Método Imunomagnético

O tecido de tumor primário foi colocado em placa estéril contendo PBS acrescido de antibiótico e então cortado inúmeras vezes com tesoura cirúrgica, processo este, realizado em capela de fluxo laminar. Os microfragmentos foram centrifugados a 2.000 r.p.m. por 5 minutos, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em filtrado de DEMEM contendo 2mg/ml de collagenase tipo I (SIGMA) e 2mg/mL de hialuronidase tipo I (SIGMA), para dissociação das células do tecido incubamos a 37°C a 135 r.p.m por no mínimo 3 horas. A suspensão celular foi passada através de agulha 23G e então centrifugada a 2000 r.p.m. por 10 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado celular foi lavado com PBS, centrifugado novamente a 2000 r.p.m. e ressuspendido em 1ml de PBS contendo 0,6% de citrato e 1% de soro de bezerro (GIBCO). Estas células foram então submetidas à recuperação através do anticorpo dirigido contra antígeno de membrana de célula epitelial ligado à partícula magnética (Ber-EP4, Dynal, Dynal-bead, Noruega) sendo então colocadas em tubo de 1,5 mL (AXYGEN), onde se adicionou 80µL do anticorpo Ber-EP4, e incubadas por 3 horas a 4°C. As células epiteliais foram então recuperadas em estante magnética (figura 2), pois, estando ligadas ao anticorpo conjugado a partícula magnética, aderem à parede do tubo.

Figura 2. Separação de células epiteliais utilizando anticorpo específico ligado à partícula magnética

Para se obter maior pureza das células epiteliais lavou-se 5 vezes com a solução tampão (PBS acrescido de 0,6% de citrato e 1% de soro de bezerro) com intervalos de 3 minutos, sempre retirando o líquido com ponteira fina do lado oposto onde os beads junto as células ficam aderidos. Após este procedimento conseguimos recuperar em média $3,6 \times 10^4$ células do tecido tumoral e $0,75 \times 10^4$ células do tecido peritumoral.

4.3 Imunocitoquímica de Células Recuperadas com o Anticorpo BER-EP4

Para estabelecer a eficiência da reação de seleção celular com anticorpo Ber-EP4, foram realizadas co-culturas de células MCF-7 com fibroblastos por 48 horas na proporção 1(fibroblasto)/10(MCF-7). As células foram recuperadas após tratamento com tripsina (0,2%) mais EDTA (0,02%) e submetidas ao protocolo de enriquecimento da fração epitelial utilizando o anticorpo Ber-EP4. Todas as células recuperadas com o anticorpo Ber-EP4 foram colocadas em lâminas de citospin.

Para realizar o citospin, as células foram suspensas em PBS e contadas em câmara de Newbauer. Alíquotas de 3×10^4 células em um

volume total de 50µl de PBS foram colocadas em cada lâmina (BioGlass Ind. Com. Ltda; Brasil). Para a montagem do citospin, as células foram colocadas dentro de funis, os quais foram conectados às lâminas, então, as mesmas foram dispostas dentro de uma Citocentrífuga (Incibrás) e centrifugadas por 3 minutos a 500 r.p.m.

Para a reação de imunocitoquímica os botões de células aderidos às lâminas foram fixados e permeabilizados com o uso de acetona 70% a temperatura ambiente por 5 minutos, lavados 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com 200µL de PBS-BSA 0,2% e incubados por 30 minutos com 200µl de PBS-BSA 2%.

Utilizou-se o anticorpo primário contra citoqueratina (anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana gerado em camundongo, clone AE1/AE3 – DAKO Corporation, Carpinteria, E. U. A.) diluído 1/100. Procedeu-se à reação utilizando-se 150µl do anticorpo diluído sobre os botões de células por um período de incubação de 1 hora em câmara úmida à T.A.. Também foram feitos os controles negativos da reação, nos quais utilizamos somente o anticorpo secundário (anticorpo monoclonal contra IgG de camundongo conjugado a TRITC, clone T7782 – SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis, E.U.A.), diluído 1/100. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com PBS-BSA 0,2% e posteriormente incubadas no escuro com o anticorpo secundário. Após esta incubação as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com 200µL de PBS-BSA 0,2% e, finalmente, foi realizada a montagem das mesmas com lamínulas de vidro

(GlassTécnica; Brasil) e usando-se uma gotícula de glicerol. As lâminas foram, então, analisadas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E600 (Japão) e as imagens capturadas em câmera digital NIKON E4500 (Japão).

Como podemos ver na figura abaixo, todas as células selecionadas com o anticorpo Ber-EP4 mostraram marcação citoplasmática positiva com o anticorpo contra citoqueratina, demonstrando assim, a alta eficiência do anticorpo Ber-EP4 em recuperar células epiteliais misturadas com as células mesenquimais (Figura 3).

Legenda: (a) Imagem de célula MCF-7 ligada ao anticorpo Ber-EP4 (AUMENTO: 200X); (b) Visualização do núcleo celular com DAPI (AUMENTO: 200X); (c) marcação imunocitoquímica de citoqueratina, células com expressão de CK19, estando ligadas ao anticorpo conjugado à partícula magnética (AUMENTO: 200X); (d) reação exclusiva com anticorpo secundário (AUMENTO: 200X)

Figura 3. Expressão imunocitoquímica de citoqueratina 19 (CK19) em células MCF-7 recuperadas com anticorpo Ber-EP4 após separação imunomagnética

4.4 Extração de RNA Total das Células Epiteliais

Para extração de RNA total, as células epiteliais foram colocadas em tubos de 1,5 ml (AXYGEN) contendo solução TRIzol® (Invitrogen Life

Technologies); isto é, uma solução monofásica de fenol e isoticianato de guanidina. Neste mesmo tubo adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, misturando-se o conteúdo em vortex, e centrifugando-o a 12 000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recuperada e passada para tubo novo, ao qual se acrescentou 500 μ L de álcool isopropílico e 1 μ L de “glicogen” (carreador de nucleotídeo, utilizado em casos de pequena quantidade de amostra) (GIBCO BRL) e foi deixado por 20 horas a -20°C. Em seguida, a solução foi centrifugada 12 000 r.p.m. por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml etanol 75%, centrifugado novamente a 7 500 r.p.m. por 5 minutos. A partir daí recuperou-se o precipitado, o qual foi dissolvido em 10 μ L água tratada com dietildicarbonato (DEPEC) (MERK – Alemanha). A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 e 280nm. Esta leitura permitiu o cálculo da concentração do RNA. A concentração média de RNA obtida de células epiteliais obtidas de amostras de tecido após separação imunomagnética foi de aproximadamente 0.01 μ g/ μ L.

4.5 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para Obtenção do cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 10 μ L de amostra de RNA total diluído em água tratada com DEPEC ao qual foram adicionados 2 μ L de hexâmeros randômico iniciadores (concentração inicial 0,5 μ g/ μ L) (Amersham Pharmacia). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos para desnaturação das fitas de RNA e então acrescentados 7 μ L de

uma mistura contendo 4 μ L de tampão da Super Script III (Invitrogen Corporation – Califórnia, E.U.A.); 2 μ L de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 2,5mM (GIBCO – BRL); 1 μ L de dietiltreitol (DTT) a 100mM (Invitrogen Corporation – Califórnia, E.U.A.), sendo incubada a 42°C por 10 minutos. Após acrescentar-se 0,5 μ L da enzima transcriptase reversa SSII-RT *super script III* (5UI/ μ L) (Invitrogen Corporation – Carlsbad, Califórnia, E.U.A.), incubou-se a reação a 42°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita de cDNA. Posteriormente, o tubo foi aquecido a uma temperatura de 70° C por 15 minutos, para inativação da enzima. Após este procedimento, o cDNA foi utilizado para a amplificação da região de interesse ou estocado a -20°C.

4.6 Elaboração dos Primers e Padronização das Reações de RT-PCR

Todos os oligonucleotídeos iniciadores descritos (tabela 4) foram desenhados a partir da seqüência de RNAm do gene em questão contidos no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. A escolha da região para confecção do oligonucleotídeo iniciador baseou-se na presença de grandes *introns* (regiões não codificadas, presentes no DNA genômico) entre os *exons* (regiões codificadas, presentes no DNA genômico e no transcrito de RNAm processado) de interesse contidos no DNA do gene. Deste modo, diminui-se a chance de reação cruzada com o DNA genômico, pois a DNA polimerase, utilizada, não sintetiza fragmentos grandes (Invitrogen). A seguir, elaborou-se o oligonucleotídeo iniciador utilizando-se o

programa *Primer 3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3). As seqüências selecionadas como oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do produto esperado estão discriminados nas tabelas abaixo (tabela 3):

As condições de RT-PCR foram padronizadas em RT-PCR convencional (descrito abaixo) para cada gene estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados

GENES	PRIMERS	SEQUÊNCIA
β-actina	direto	5'CAGCTCACCATGGATGATGA3'
	indireto	5'CCACATAGGAATCCTTCTGA3'
E-caderina	direto	5'CTTGGTCTACGCCTGGGACT3'
	indireto	5'TGTGAGCAATTCTGCTTGGA3'
Snail	direto	5'TGGGTGAATTCGGGCTTG3'
	indireto	5'CAAGATGCACATCCGAAGC3'
Hakai	direto	5'TCACTGCACAGGATCACTAC3'
	indireto	5'TAAAGGGGGTGAGCTGTTTG3'

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados

GENES	Éxon i	Éxon f	cDNA	DNAg
E-caderina	3	4	150 pb	6.000 pb
Snail	3	3	134 pb	3.645 pb
Hakai	3	6	243 pb	4.710 pb

Legenda: cDNA = número de pares de bases da seqüência de DNA complementar ao RNAm alvo; DNAg = DNA genômico, somatória do número de pares de bases correspondentes à seqüência do DNA genômico; exon i = exon inicial, exon f = exon final.

Tabela 4. Condições de temperatura determinadas para realização da RT-PCR em tempo real. AQUEC. INICIAL = aquecimento inicial

	AQUEC. INICIAL	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	AMPLIFICAÇÃO
β -actina	2' a 95 °C	15'' a 95°C	1' a 64°C	1' a 72°C
E-caderina	2' a 95 °C	15'' a 95°C	1' a 64°C	1' a 72°C
Snail	2' a 95 °C	15'' a 95°C	1' a 64°C	1' a 72°C
Hakai	2' a 95 °C	15'' a 95°C	1' a 64°C	1' a 72°C

4.7 Padronização do Método de RT-PCR

Para determinar o número dos ciclos ideal e a melhor temperatura a ser utilizada em RT-PCR em tempo real para o estudo da expressão de E-caderina, Snail e Hakai, utilizamos em RT-PCR convencional células de várias origens, isto é, linhagens epiteliais mamárias não tumorais (MCF-10 e HB4a) e malignas (MCF-7 e MDA-MB231); fibroblastos, obtidos a partir de cultura primária de tecido mamário de pacientes com tumor de mama (FT) e de mama sem câncer (FN); mononucleares, obtidos do sangue periférico de indivíduos sadios (LL, LC e LD). As linhagens epiteliais estão descritas abaixo:

- **HB4a** – Célula epitelial luminal mamária obtida de mamoplastia e imortalizada pela transfecção do vírus SV40 (Harris RA et al. 1995);
- **MCF-10A** – Linhagem epitelial derivada da glândula mamária de paciente com doença fibrocística (American Type Culture Collection – ATCC, Manassas, E.U.A. Número de catálogo = CRL-10317);

- **MCF-7** – Linhagem de câncer de mama derivada de efusão pleural de paciente com câncer de mama metastático. Esta linhagem expressa receptores de estrógeno (ATCC. Número de catálogo = HTB-22);
- **MDA-MB-231** – Linhagem de câncer de mama derivada de efusão pleural de paciente com câncer de mama metastático. Esta linhagem expressa receptores do fator de crescimento epidermal (EGF) e do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e não expressa receptores de estrógeno. Esta linhagem é tumorigênica e origina metástases se injetada em animais (ATCC. Número de catálogo = HTB-26);
- **HL-60** – linhagem obtida de sangue periférico de paciente com leucemia promielocítica aguda (ATCC. Número de catálogo = CCL-240).

A pesquisa da expressão da β -actina foi realizada como controle para detectar a presença de amostra (Figura 4).

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. (FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário; FN – fibroblasto de cultura primária, obtido de mama sem câncer) e mononucleares de doadores normais (LL, LC e LD – mononucleares do sangue periférico). As bandas correspondem ao produto amplificado da RT-PCR (300pb). CN- = controle negativo (reação sem amostra)

Figura 4. Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de β -actina em linhagens celulares e fibroblastos

A expressão de E-caderina foi observada em células MCF-10 e MCF-7 e HB4a, mas não em MDA-MB231, fibroblastos originários de tumor de mama e mama sem câncer, como também não em mononucleares do sangue periférico (Tabela 5 e Figura 5) após 35 ciclos.

Tabela 5. Expressão da E-caderina em células epiteliais, fibroblastos e linfócitos

GENE	ciclos	MCF10	MCF7	MDA	HB4a	FT	FN	LC	LD	NEG.
E-caderina	35	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário. FN – fibroblasto de cultura primária obtido de mama sem câncer; LC e LD – mononucleares de sangue periférico de doadores sadios

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário; FN – fibroblasto de cultura primária, obtido de mama sem câncer) e mononucleares de doadores normais (LC e LD – mononucleares do sangue periférico). As bandas correspondem ao produto amplificado da RT-PCR (130pb). CN= controle negativo, (reação sem amostra)

Figura 5. Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de E-caderina em linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos

A expressão de Snail foi observada em células MCF-10, MCF-7, MDA-MB231, HB4a, linhagens de fibroblastos e não expressa em mononucleares de pacientes sadios (Tabela 6 e Figura 6) após 30 ciclos.

Tabela 6. Expressão da Snail em células epiteliais, fibroblastos e linfócitos

GENE	ciclos	MCF10	MCF7	MDA	HB4a	FT	FN	LD	LC	NEG.
Snail	30	+	+	+	+	+	+	-	-	

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário; FN – fibroblasto de cultura primária, obtido de mama sem câncer; LD e LC – mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário; FN – fibroblasto de cultura primária, obtido de mama sem câncer) e mononucleares de doadores normais (LC e LD – mononucleares do sangue periférico). As bandas correspondem ao produto amplificado da RT-PCR (134pb). CN- = controle negativo (reação sem amostra)

Figura 6. Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de Snail em linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos

A expressão de Snail foi observada em células MCF-10, MCF-7, MDA-MB231, HB4a, HL60, linhagens de fibroblastos e mononucleares de pacientes saudáveis após 35 ciclos e bastante expressa nos ciclos seguintes (Tabela 7 e Figura 7).

Tabela 7. Expressão da Snail em células epiteliais, fibroblastos e linfócitos.

GENE	ciclos	MCF10	MCF7	MDA	HB4a	LC	LD	FN	FT	NEG.
Snail	35	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário; FN – fibroblasto de cultura primária, obtido de mama sem câncer); LC e LD – mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis.

Legenda: MCF10, MCF7, MDA, HB4a: linhagem de células epiteliais. FT – fibroblasto de cultura primária, obtido de paciente com tumor mamário; FN – fibroblasto de cultura primária, obtido de mama sem câncer) e mononucleares de doadores normais (LC e LD – mononucleares do sangue periférico). As bandas correspondem ao produto amplificado da RT-PCR (150pb). CN- = controle negativo, (reação sem amostra)

Figura 7. Gel de agarose correspondente à expressão de RNAm de Hakai em linhagens celulares, fibroblastos e linfócitos

4.8 RT-PCR em Tempo Real

A RT-PCR em tempo real avalia o acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, sendo atualmente considerado um método bastante preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica.

Utilizamos o sistema de detecção por SYBR *Green*, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada SYBR *Green I*, que quando intercalada à dupla fita da DNA, passa a ser detectável. Durante os ciclos iniciais da reação de RT-PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo SYBR *Green I* é fraco para ser detectado, isto é, não ultrapassa o sinal de fluorescência de fundo. Entretanto, no decorrer dos ciclos da reação de RT-PCR, há o aumento do produto amplificado e conseqüentemente o aumento do sinal de emissão de fluorescência, passando a ser detectável, sendo

assim os valores são quantificados depois de um número fixo de ciclos, o que representa a quantidade final de cada produto acumulado, diferente da reação de RT-PCR convencional. A metodologia que utiliza o SYBR Green I exige cuidadosa padronização, uma vez que este fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A especificidade da detecção de fluorescência com SYBR Green I pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos de amplificação inespecíficos. Todos estes fatores levam à formação de moléculas de dupla fita não esperadas, as quais incorporam o SYBR Green I e têm sua fluorescência registrada.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui um T_m específico, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes.

Durante a reação de RT-PCR em tempo real a cada ciclo de polimerização a fluorescência aumenta, atingindo um limiar ou “threshold”, onde podemos comparar e analisar a fluorescência das amostras. O “threshold” deve estar obrigatoriamente na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência de base ou “background”.

O limiar é definido na fase exponencial da reação, o seja, é quando a quantidade de produto formado é satisfatório em relação à concentração inicial de fitas molde. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar (Ct) ou “threshold cycle”. Então o Ct indica o número de ciclo no qual a quantidade de alvo amplificado atinge o limiar definido pelo pesquisador.

Quando a eficiência da reação de RT-PCR está próxima de 100% o número de cópias geradas a cada ciclo se duplica, aumentando de forma exponencial. Amostra com mais alvos atingem o limiar mais precocemente, logo seus Cts são mais baixos.

A equação **$N_f = N_o (1+E)^n$** descreve a amplificação exponencial de RT-PCR, onde **N_f** é o número de fita-molde em um determinado ciclo da reação, **N_o** é o número de fita molde inicial, **E** é a eficiência de amplificação da reação e **n** é o número de ciclo.

Considerando que a eficiência da reação seja de 100% (logo $E=1$) que n seja um ponto escolhido na amplificação idêntico a todas as amostras, poderemos obter o número de fitas-molde presente no início da reação, com a equação: **$N_f = N_o \times 2^{-C_T}$** .

A análise da expressão gênica por meio de RT-PCR em tempo real usado em nosso estudo representa uma quantificação relativa dos genes de interesse, uma vez que requer um controle endógeno, ou seja, um gene cuja expressão não apresente variação estatisticamente significativa entre as amostras analisadas. O controle endógeno utilizado foi β -actina sendo seus níveis avaliados nas mesmas condições do gene de interesse.

A quantificação relativa por RT-PCR em tempo real para uma determinada amostra é dada pela relação do Ct do gene de interesse e o Ct do controle endógeno. Assim temos:

$$\text{Nfi} = \text{Noi} \times 2^{-\text{Cti}} \text{ (gene de interesse)}$$

$$\text{Nfe} = \text{Noe} \times 2^{-\text{Cte}} \text{ (gene endógeno)}$$

Sendo que Nfi/Nfe é a quantidade normalizada de moléculas do gene de interesse em relação ao número de moléculas do controle endógeno que iremos chamar de X, e Noi e Noe uma constante que nomeamos por K, a equação fica: $\mathbf{X = K \cdot 2^{-\Delta Ct}}$

A quantificação relativa da expressão gênica é usada para descrever mudanças na expressão de um gene de interesse em um grupo de amostras em relação a um grupo de referência, neste trabalho foi usada uma única amostra extraída de células HB4a. Assim o valor de X é medido em duas diferentes condições, logo dividimos a condição A pela condição B e obtemos $\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct}}$, como mostra equação a seguir:

$$\text{Xa} = \text{K} \times 2^{-\Delta \text{Cta}}$$

$$\text{Xb} = \text{K} \times 2^{-\Delta \text{Ctb}}$$

Método esse usado em nossos estudos para determinar os níveis de expressão relativa de dois genes de interesse.

4.9 Padronização das Condições da Reação de RT-PCR Quantitativa

Para cada reação de RT-PCR em tempo real foram utilizados 5µL de cDNA diluído 1/100, 0.6µL de MgCl₂ (50mM), 2µL de dNTP (2.5mM), 1µL de cada oligonucleotídeo (direto e reverso) (10µM), 1µL de DMSO 10X, , 0.3µL de DNA polimerase Taq Platinum (5U/µL), 0.2µL de Sybr Green (1/100). Utilizamos o termociclador Light Cycler™ (Roche Diagnostics, Alemanha). As condições para as reações de RT-PCR em tempo real foram padronizadas utilizando-se as linhagens celulares HB4A, MCF-7, MDA-MB 231 (descritas acima) e HL-60 (linhagem obtida de sangue periférico de paciente com leucemia promielocítica aguda. ATCC. Número de catálogo = CCL-240).

As condições para RT-PCR em tempo real foram as estabelecidas na RT-PCR convencional. Foram realizados 45 ciclos para todos *primers*. A temperatura de aquisição da fluorescência encontra-se na tabela 8.

Padronizou-se a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão dos genes E-caderina, Snail e Hakai, como também de β-actina, utilizando-se RNA obtido de linhagens epiteliais de mama sem e com câncer (HB4a, MCF-7, MDA-MB-231) e uma linhagem hematopoiética (HL60).

Ao final da reação de RT-PCR em tempo real obtivemos as curvas de quantificação da expressão e de desnaturação da reação, ou seja:

1. A curva de quantificação da expressão gênica, que se dá a partir do Ct (ciclo limite ou *threshold cycle*), parâmetro definido como o número de ciclo em que a fluorescência gerada pelo SYBR green I atinge um limite acima da fluorescência de fundo, resultando na

quantificação da expressão gênica em relação à amostra analisada (Tabela 8 e Figura 8);

2. A curva de desnaturação ou *melting curve* que permite a confirmação da especificidade da amplificação, onde são relacionadas a fluorescência e a temperatura; esta curva consiste da monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura de fusão até a *melting temperature* (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação (Figura 9).

As reações foram feitas em duplicatas e os resultados do Ct nas duplicatas demonstraram-se satisfatórios, pois a diferença entre eles não ultrapassou dois. A curva de desnaturação também se revelou adequada, pois se demonstrou um único pico de T_m , resultante de um único produto, mostrando assim a especificidade da reação. Esses resultados definiram as condições ideais de amplificação para todos os genes na RT-PCR em tempo real.

Tabela 8. Condições da RT-PCR em tempo real

	DESNATURAÇÃO INICIAL	TEMP. AQUIS. FLUORESCÊNCIA	DA 45 CICLOS ANELAMENTO
β -actina	2' a 95 °C	72 °C	1'64 °C
E-caderina	2' a 95 °C	72 °C	1'64 °C
Snail	2' a 95 °C	84 °C	1'64 °C
Hakai	2'a 95 °C	83 °C	1'64 °C

Legenda: TEMP. AQUIS. DA FLUORESCÊNCIA= temperatura de aquisição da fluorescência

Legenda: As curvas no eixo X denotam o número de ciclos de amplificação e no eixo Y a intensidade de fluorescência. Cada curva representa uma amostra. O limiar de detecção de fluorescência está relacionado à expressão do gene alvo

Figura 8. Curva de quantificação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real do gene da SNAIL com linhagens celulares epiteliais e hematopoiéticas

Legenda: Após o término da reação, uma etapa de dissociação é realizada para visualizar a cinética de dissociação dos produtos amplificados. Aumenta-se a temperatura de forma linear e a fluorescência de cada amostra é representada graficamente. O eixo X mostra a temperatura e o eixo Y a intensidade de fluorescência

Figura 9. Curva de desnaturação por RT-PCR em tempo real do gene da Snail com linhagens celulares epiteliais e hematopoiética

4.10 Análise Estatística

Para analisar a diferença de expressão entre variáveis foi utilizado método não paramétrico; pareado (Wilcoxon) e não pareado (Mann Whitney). As correlações entre as variáveis foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. O nível de significância foi bicaudado e menor ou igual a 0,05. Utilizamos o programa estatístico SPSS versão 11.0, Chicago, Illinois, EUA.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão de E-caderina

A expressão de E-caderina foi observada nas amostras de células epiteliais de amostras de tumor de 37 pacientes e de tecido peritumoral de 30 e não observamos diferença entre elas (Tabela 9 e Figura 10). Em 24 amostras tumorais e peritumorais correspondentes, também não observamos diferença na expressão de E-caderina, utilizando análise pareada (Tabela 10). Entretanto houve correlação positiva entre a expressão de E-caderina nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral correspondente ($n=24$; $r=0,805$; $p<0,001$, correlação de Spearman) (Figura 11).

Tabela 9. Expressão de E-caderina nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama

amostra	n	média	DP
Peritumoral	30	14,767	39,875
tumoral	37	60,1004	226,529

($p= 0,338$, teste de Mann-Whitney)

Legenda: ECADNLTU- valores de E-caderina em células peritumorais e tumorais.

Boxplot mostra a distribuição de todos os valores entre as barras (percentis 25%, 50% e 75% dentro da caixa), exceto valores extremos (°: valores ultrapassam 1,5-3,0 vezes a dimensão da caixa além do percentil 75%; *: valores que ultrapassam 3,0 vezes a dimensão da caixa além do percentil 75%).

Figura 10. Distribuição dos valores de expressão de E-caderina nas amostras de células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral

Tabela 10. Expressão de E-caderina nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral correspondente de pacientes com carcinoma ductal de mama

amostra	n	média	DP
Peritumoral	24	12,076	33,917
tumoral	24	60,151	264,463

($p=0,095$, teste de Wilcoxon)

Legenda: ECADTU- E-caderina nas células epiteliais tumorais, ECADNL- E-caderina nas células epiteliais peritumorais

Figura 11. Correlação entre a expressão de E-caderina nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral

5.2 Expressão de Snail

A expressão de Snail foi observada nas amostras de células epiteliais de amostras de tumor de 36 pacientes e de tecido peritumoral de 29 e não observamos diferença entre elas (Tabela 11 e Figura 12). Em 27 amostras tumorais e peritumorais correspondentes, também não observamos diferença na expressão de Snail, utilizando análise pareada (Tabela 12). Não houve correlação entre a expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral ($n=27$; $r=0,315$; $p=0,109$, correlação de Spearman) (Figura 13).

Tabela 11. Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama

amostra	n	média	DP
Peritumoral	29	588,255	1 440,430
tumoral	36	701,052	2986,590

($p=0,526$, teste de Mann-Whitney)

Figura 12. Distribuição dos valores de expressão de Snail nas amostras de células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral

Tabela 12. Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral correspondente de pacientes com carcinoma ductal de mama

amostra	n	média	DP
Peritumoral	27	610,595	1 490,896
tumoral	27	871,294	3 437,497

($p=0,631$, teste de Wilcoxon)

Legenda: SNAILTU- Snail nas células epiteliais tumorais, SNAILNL- Snail nas células epiteliais peritumorais

Figura 13. Correlação entre a expressão de Snail nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral

5.3 Expressão de Hakai

A expressão de Hakai foi observada nas amostras de células epiteliais de amostras de tumor de 33 pacientes e de tecido peritumoral de 27 e não observamos diferença entre elas (Tabela 13 e Figura 14). Em 24 amostras tumorais e peritumorais correspondentes, também não observamos

diferença entre a expressão de Hakai, utilizando análise pareada (Tabela 14). Entretanto, houve correlação positiva entre a expressão de Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral correspondentes ($n=24$; $r=0,477$; $p=0,019$, correlação de Spearman) (Figura 15).

Tabela 13. Expressão de Hakai nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama

amostra	n	Média	DP
Peritumoral	27	41,149	108,390
tumoral	33	48,797	94,784

($p=0,204$, teste de Mann-Whitney)

Legenda: HAKAINLTU- Hakai nas células epiteliais peritumorais e tumorais

Figura 14. Distribuição dos valores de expressão de Hakai nas amostras de células epiteliais de tecido tumoral e peritumoral

Tabela 14. Expressão de Hakail nas células epiteliais de amostras de tecido tumoral e peritumoral correspondente de pacientes com carcinoma ductal de mama

amostra	n	Média	DP
Peritumoral	24	44,265	114,550
tumoral	24	59,535	106,429

($p=0,209$, teste de Wilcoxon)

Legenda: HAKTU- Hakai nas células epiteliais tumorais, HAKNL- Hakai nas células epiteliais peritumorais

Figura 15. Correlação entre a expressão de Hakai nas células epiteliais de tumor e tecido peritumoral

5.4 Correlação entre a expressão de E-caderina, Snail e Hakai em amostras de câncer de mama

Em amostras de células epiteliais de tecido tumoral observamos correlação positiva entre a expressão de E-caderina e Snail ($n=31$, $r=0,558$,

$p=0,001$, correlação de Spearman) (figura 16), E-caderina e Hakai ($n=28$, $r=0,534$, $p=0,003$, correlação de Spearman) (Figura 17), e Snail e Hakai ($n=32$, $r=0,587$, $p<0,001$, correlação de Spearman) (Figura 18).

Legenda: SANILTU - Snail nas células epiteliais tumorais, ECADTU- E-caderina nas células epiteliais tumorais

Figura 16. Correlação entre a expressão de Snail e E-caderina nas células epiteliais de tumor

Legenda: HAKTU-Hakai nas células epiteliais tumorais, ECADTU- E-caderina nas células epiteliais tumorais

Figura 17. Correlação entre a expressão de Hakai e E-caderina nas células epiteliais de tumor

Legenda: SNAILTU-Snail nas células epiteliais tumorais, HAKTU- Hakai nas células epiteliais tumorais

Figura 18. Correlação entre a expressão de Snail nas células epiteliais de tumor e Hakai nas células epiteliais de tumor

Legenda: HAKNL - Hakai nas células epiteliais peritumorais, SNAILNL- Snail nas células epiteliais peritumorais

Figura 20. Correlação entre a expressão de Hakai nas células epiteliais peritumorais e Snail nas células epiteliais peritumorais

Legenda: ECADNL - E-caderina nas células epiteliais peritumorais, SNAILNL - Snail nas células epiteliais peritumorais

Figura 21. Correlação entre a expressão de E-caderina nas células epiteliais peritumorais e Snail nas células epiteliais peritumorais

5.5 Expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de amostras de tecido tumoral de acordo com o comprometimento linfonodal

Determinamos a expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com e sem comprometimento linfonodal e não observamos variação da expressão destas moléculas entre os grupos de pacientes (Tabela 15 e Figuras 22 a 24).

Tabela 15. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com carcinoma ductal de mama sem e com comprometimento axilar

	E-caderina	Snail	Hakai
LN (-)	22,7±90,9 (a) N=20	1173±4214,7 (c) N=18	58,9±86,5 (e) N=18
LN (+)	110,3±328 (b) N=16	239,8±364,2 (d) N=17	36,9±109,5 (f) N=14

Legenda: LN (-) sem e com LN (+) comprometimento axilar. a x b, p=0,157; c x d, p=0,597; e x f, p=0,447; Teste de Mann-Whitney

Legenda: ECADTU- E-caderina nas células epiteliais tumorais

Figura 22. Expressão de E-caderina nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes sem e com comprometimento axilar

Legenda: SNAILTU- Snail nas células epiteliais tumorais

Figura 23. Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes sem e com comprometimento axilar

Legenda: HAKTU - Hakai nas células epiteliais tumorais

Figura 24. Expressão de Snail nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes sem e com comprometimento axilar

5.6 Expressão E-caderina, Snail e Hakai em Células Epiteliais de Amostras de Tecido Tumoral de Acordo com o Status de Receptores ER, PR e c-Erb B2

A expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de tecido tumoral foi determinada em pacientes com receptores hormonais positivos e negativos (Tabelas 16 e 17) e não observamos variação entre os resultados, assim como não encontramos variação na determinação destas moléculas em pacientes com tumores c-Erb B2 positivo ou negativo (Tabela 18).

Tabela 16. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com receptor de estrógeno positivo e negativo com carcinoma ductal de mama

	E-caderina	Snail	Hakai
ER (-)	57,3±126,9 (a) N=7	137,06± 221,6 (c) N=7	3,9± 3,3 (e) N=5
ER (+)	60,7± 245,6 (b) N=30	837,1± 3322,7 (d) N=29	56,8± 101,0 (f) N=28

Legenda: a x b, p=0,163; c x d, p=0,889; e x f, p=0,209; Teste de Mann-Whitney

Tabela 17. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com receptor de progesterona positivo e negativo com carcinoma ductal de mama

	E-caderina	Snail	Hakai
PR (-)	211,2±455,7 (a) N=8	170,9±216,5 (c) N=10	61,3±144,2 (e) N=8
PR (+)	18,4 ±75,6 (b) N=29	904,9±3509,2 (d) N=26	44,7±76,4 (f) N=25

Legenda: a x b, p=0,197; c x d, p=0,417; e x f, p=0,933; Teste de Mann-Whitney

Tabela 18. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com expressão de c-Erb B2 (2 ou 3+) e negativo com carcinoma ductal de mama

	E-caderina	Snail	Hakai
c-Erb b2 (-)	6,4±11,4 (a) N=25	949,5±3645,9 (c) N=24	34,6±67,0 (e) N=22
c-Erb b2 (+)	171,8±384,0 (b) N=12	189,5±444,5 (d) N=11	84,3±139,0 (f) N=10

Legenda: a x b, p=0,948; c x d, p=0,095; e x f, p=0,776; Teste de Mann-Whitney.

5.7 Expressão de E-caderina, Snail e Hakai em Células Epiteliais de Amostras de Tecido Tumoral de Acordo com o Tamanho do Tumor e Estadiamento Clínico-Patológico

A expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de tecido tumoral foi determinada e analisada em relação ao tamanho do tumor (Tabela 19) e ao estadiamento clínico-patológico (Tabela 20) e não observamos variação entre os resultados.

Tabela 19. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com tumores de até 2,0cm e tumores maiores 2,0cm com carcinoma ductal de mama

	E-caderina	Snail	Hakai
Tumor até 2 cm	84,1±324,4 (a) N=16	1255,8±4469,2 (c) N=16	75,7±125,0 (e) N=15
Tumor >2 cm	41,7± 112,3 (b) N=21	257,2± 442,1 (d) N=20	26,3± 53,4 (f) N=18

Legenda: a x b, p=0,890; c x d, p=0,874; e x f, p=0,366; Teste de Mann-Whitney

Tabela 20. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes com estadiamento clínico-patológico I, II ou III com carcinoma ductal de mama

	E-caderina	Snail	Hakai
ECP I	3,6± 4,6 (a) N=11	1853,4±5670,6 (d) N=10	63,8±97,9 (g) N=10
ECP II	126,0± 326,9 (b) N=17	311,1± 442,5 (e) N=17	62,9± 117,9(h) N=14
ECP III	4,6± 6,9 (c) N=8	172,6± 397,0 (f) N=8	7,4±12,6 (i) N=8

Legenda: a x b x c, p=0,828; d x e x f, p=0,746 ; g x h x i, p=0,246 ; teste de Kruskal-Wallis.

5.8 Expressão de E-caderina, Snail e Hakai em Células Epiteliais de Amostras de Tecido Tumoral de Acordo com o Status Menopausal

A expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais de tecido tumoral foi analisada em relação ao status menopausal das pacientes (pré e pós-menopausa) (Tabela 21) e não observamos variação entre os resultados.

Tabela 21. Expressão de E-caderina, Snail e Hakai nas células epiteliais de tecido tumoral de pacientes em pré e pós menopausa com câncer de mama

	E-caderina	Snail	Hakai
Pré-menopausa	28,7±94,7 (a) N=13	73,0± 103,0 (c) N=11	36,2± 76,3 (e) N=8
Pós-menopausa	77,7± 273,4 (b) N=24	974,7± 3570,4 (d) N=25	52,8± 101,0 (f) N=25

Legenda: a x b, p=0,455; c x d, p= 0,986; e x f, p=0,933, teste de Mann-Whitney

6 DISCUSSÃO

Para o câncer de mama tornar-se invasivo, as células tumorais necessitam reduzir sua coesão intercelular e aumentar sua mobilidade, num processo semelhante ao que ocorre durante a embriogênese e recebe o nome de transição epitélio-mesênquima (Thiery, 2002; Lee et al., 2006; De Craene et al., 2005).

Estudos indicam que TEM ocorre durante a conversão maligna da célula epitelial, refletindo o potencial que as células epiteliais tumorais apresentam de reverter seu programa de expressão gênica para um fenótipo mesenquimal e adquirir capacidade de ultrapassar a membrana basal (Rosivatz et al., 2004; Lee et al., 2006; De Craene et al., 2005). No entanto, esta não é a opinião de outros autores (Thompson et al., 2005; Tarin et al., 2005). O processo de TEM talvez não seja unicamente ocasionado por uma reprogramação da expressão gênica da célula epitelial, mas sim por interação entre componentes epiteliais e mesenquimais, mediada por produtos como fatores de crescimento e integrinas que modificam os fibroblastos da matriz extracelular que por sua vez atuam de forma diferenciada na progressão tumoral da célula epitelial; como que por um mecanismo parácrino (Tarin et al. 2005; Kalluri e Zeisberg, 2006).

A principal molécula de adesão célula-célula implicada na diferenciação do epitélio e restrição de mobilidade é a E-caderina (Qureshi et al., 2006). Vários são os mecanismos que controlam a expressão da E-

caderina descritos: mutação, metilação, repressão transcricional, e degradação da proteína (Cheng et al., 2001; Caldeira et al., 2006). Os carcinomas lobulares invasivos da mama têm sido descritos como um dos tumores de mama que mais freqüentemente apresenta características fenotípicas de TEM, como crescimento infiltrativo difuso e perda quase universal de expressão de E-caderina (Thiery, 2002). Outros autores descrevem, porém que os tumores que mais caracteristicamente apresentam a TEM e mais facilmente se evidencia tal diferenciação são os carcinossarcomas e os carcinomas metaplásicos (Petersen et al., 2003). Nos carcinomas ductais invasivos da mama a perda de expressão de E-caderina parece ser bem menor e a relação deste tipo histológico com a TEM ainda não é bem pela literatura (Qureshi et al., 2006; Caldeira et al., 2006), motivo pelo qual nos atentamos especificamente ao seu estudo. Outro aspecto importante do nosso estudo foi avaliar a expressão de moléculas relacionadas ao processo de transição epitélio-mesênquima somente em células epiteliais; separadas do restante do tecido. Optamos pela análise da expressão de transcritos pelo método possibilitar estudo simultâneo da expressão de várias moléculas quando se dispõe de pequena quantidade de material (utilização racional das amostras) e utilizamos um método quantitativo, a RT-PCR em tempo real. Para a célula atingir a rede linfática ou sangüínea ela precisa se desprender do tumor; portanto é possível que uma baixa expressão de E-caderina seja relacionada ao processo de TEM e a um comprometimento linfonodal axilar mais freqüente (Qureshi et al., 2006; Lee et al., 2006). Por este motivo outro passo relevante de nosso trabalho foi

de correlacionar a expressão de E-caderina e as moléculas que seriam responsáveis por sua variabilidade de expressão (Snail e Hakai) com o comprometimento linfonodal.

A perda da expressão da E-caderina em carcinoma ductal de mama não parece ser um evento precoce da progressão tumoral, entretanto, sua expressão é freqüentemente encontrada em tumores metastáticos da mama (Thiery, 2002). Trabalhos relacionam ainda diferentes taxas de expressão de E-caderina no carcinoma ductal invasivo. Alguns autores relatam expressão presente em 100% dos tumores (Qureshi et al., 2006) enquanto outros referem redução de sobrevida livre de doença e maior dimensão tumoral, graus histológicos mais elevados e ausência de expressão de receptores de estrógeno nas 7% de amostras onde inexiste a expressão de E-caderina (Rakha et al., 2005).

De acordo com estes autores, nossos dados indicam que a expressão de E-caderina está presente em todas as amostras tumorais e é similar no tumor e no tecido peritumoral em pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama. Outra observação foi que quando o tecido normal peritumoral tem maior expressão de E-caderina isto se verifica também no tumor, pois detectamos uma correlação positiva entre amostras da mesma paciente. Por outro lado, não encontramos expressão diferenciada de E-caderina em amostras de pacientes com comprometimento axilar ou estadiamento clínico-patológico mais avançado. Rakha et al. (2005), entretanto, determinaram a expressão protéica através de método de tissue-array, onde se avalia reduzida amostra tecidual. Thiery (2002) demonstram que a perda

da expressão da E-caderina pode não ser homogênea, com focos tumorais E-caderina (+) e focos (-) (Thiery, 2002). Outra hipótese para explicar nossos dados de não variação da expressão de mRNA de E-caderina entre tumor e tecido peritumoral, seria que o produto resultante permanecesse no citoplasma e não se apresentasse na membrana, o que alteraria sua função.

O papel da expressão de Snail como causa da repressão transcricional de E-caderina também ainda não é definida de forma clara no carcinoma ductal invasivo da mama. Estudos demonstram uma tendência a maior percentagem de tumores com redução de E-caderina entre os tumores que expressam Snail (Thiery, 2002), entretanto tal correlação não é observada por todos os autores (Blanco et al., 2002). Em nosso estudo detectamos uma correlação positiva entre a expressão de E-caderina e de Snail na célula tumoral, o que difere do processo de repressão transcricional proposto pela literatura (Thiery, 2002). Entretanto, estudo em linhagem de câncer de cólon também indica que a hiperexpressão de Snail pode não estar associada à repressão da expressão de E-caderina (De Craene et al., 2005). Segundo este autor, a repressão de adesão celular nas células epiteliais que expressam Snail seria causada pela repressão de outras moléculas de adesão que não a E-caderina como, por exemplo, a Claudina-4, um importante componente das junções apertadas (tight junctions).

A expressão de Snail é descrita por alguns autores como suposto fator prognóstico em câncer de mama, visto que apresenta relação direta com desdiferenciação celular, ou seja, quanto maior a taxa de expressão de Snail maior o grau do tumor e o comprometimento linfonodal axilar (Blanco

et al., 2002). Estes autores analisaram a expressão de mRNA de Snail por hibridização in situ em 17 amostras de carcinoma ductal invasivo, sendo que somente 5 delas provenientes de pacientes sem comprometimento linfonodal. Neste pequeno grupo, os autores observaram que a expressão de mRNA de Snail ocorre predominantemente em tumor de pacientes com comprometimento linfonodal. Por outro lado, em uma amostra de mama normal, não detectaram a expressão de Snail. Portanto, a pequena amostra dificulta o estabelecimento de resultados definitivos. Além disso, outros autores ainda correlacionam a expressão de Snail com aumento de recorrência e diminuição de sobrevida livre de doença em câncer de mama (Moody et al., 2005).

Usando um método de análise quantitativa, não observamos variação da expressão de mRNA de Snail entre as células epiteliais do tumor e do tecido peritumoral, nem tampouco expressão diferenciada nas pacientes com comprometimento linfonodal ou estadiamento clínico-patológico mais avançado. Também não encontramos expressão diferenciada nas pacientes com alto grau tumoral como descrito anteriormente (Blanco et al., 2002).

A expressão de E-caderina pode ainda ser controlada por outros fatores repressores transcricionais como slug, ZEB1, ZEB2, mas como não detectamos variação da expressão de mRNA de E-caderina em carcinoma ductal invasivo nossa proposta foi estudar outro mecanismo de regulação: seu processo de degradação.

A molécula Hakai, uma E3-ligase relacionada ao processo de degradação protéica pelo sistema de ubiquitina-proteassoma (Fujita et al.

2002) poderia ser uma causa de alteração da expressão de E-caderina por um mecanismo pós-transcricional, onde a expressão de mRNA de E-caderina fosse mantida entre o tumor e tecido peritumoral, porém sua degradação aumentada evitaria que a proteína funcionante cumprisse seu papel de adesão celular.

Em nosso estudo não observamos variação da expressão de Hakai entre o tumor e o tecido peritumoral, assim como não observamos expressão diferenciada nas pacientes com comprometimento linfonodal ou estadiamento clínico-patológico mais avançado. O que pudemos observar foi que a expressão de E-caderina na célula tumoral tem correlação positiva com a expressão de Hakai nestas mesmas células, ou seja, talvez as moléculas de E-caderina produzidas nas células tumorais não sejam funcionantes pela intensa degradação que sofrida pelo excesso de moléculas de Hakai, porém este mesmo achado de correlação positiva foi encontrado no tecido peritumoral, o que nos impede de concluir tal mecanismo nas células tumorais.

Portanto, a expressão de E-caderina não sofre redução em células epiteliais de carcinoma ductal invasivo em relação às células epiteliais do tecido normal adjacente. É possível que toda a mama, exposta aos mesmos agentes carcinogênicos apresentem uma regulação similar da expressão de E-caderina bem como de sua regulação, pois também não observamos diferenças na expressão de Snail e Hakai em tecido tumoral e peritumoral correspondente.

7 CONCLUSÕES

Em carcinoma ductal invasivo da mama não observamos diferença na expressão de E-caderina, Snail e Hakai entre células epiteliais tumorais e peritumorais.

Observamos correlação positiva entre a expressão tumoral de E-caderina e Snail, E-caderina e Hakai e Snail e Hakai indicando que outras moléculas estejam implicadas no processo de invasão tumoral neste grupo de pacientes.

Pudemos observar que em carcinoma ductal invasivo da mama a expressão de E-caderina, Snail e Hakai em células epiteliais tumorais não está relacionada a características clínico-patológicas dos tumores, como ER, PR, c-ErbB2 ou ECP ou ao comprometimento linfonodal destas pacientes, indicando que estes não são marcadores de metástase linfonodal em carcinoma ductal invasivo da mama.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med*. 1997;75:429-39.

Bissel MJ, Radisky D. Putting tumors in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:46-54.

Bissel MJ, Radisky D, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. 2002;70:537-46.

Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002;21:3241-6.

Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Moraes Netto FA, Rainho CA, Rogatto SR. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:48.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-

mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2:76-83.

Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, Shen CY. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene.* 2001;20:3814-23.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robins: pathologic basis of disease.* 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999. The breast; p.1093-95.

De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* 2005;65:6237-44.

Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 1984;44:4217-23.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R, Poisson R, Shibata H, Volk H. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer.* 1983;52:1551-7.

Friedl P, Wolf K. Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:362-74.

Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 2002;4:222-31.

Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002;277:39209-16.

Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 2004;118:277-9.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:392-401.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006;172:973-81.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*. 2005;8:197-209.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 2004;9:361-77.

Pece S, Gutkind JS. E-cadherin and Hakai: signaling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol*. 2002;4:E72-4.

Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*. 2003;278:21113-23.

Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol*. 2003;162:391-402.

Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR, Riggins G, Polyak K. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res*. 2001;61:5697-702.

Qureshi HS, Linden MD, Divine G, Raju UB. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:377-85.

Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*. 2005;46:685-93.

Raw I, Ho PL. Integração e seus sinais. São Paulo: Editora Unesp; 2000.

Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, Hofler H, Becker KF. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer*. 2004;111:711-9.

Shackney SE, Silverman JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol*. 2003;10:278-90.

Sobin LH, Wittekind Ch. *TNM Classification of malignant tumours*. 6a ed. Tradução do Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2006. Tumores de mama; p.137-48.

Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulis V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the

peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002;15;20:3404-12.

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res*. 2005;65:5996-6001.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:442-54.

Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*. 2005;65:5991-5.

Vincent-Salomon A, Thiery JP. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res*. 2003;5:101-6.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weiberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117:927-39.