Mateus de Camargo Barros Filho

**Expressão de grupos de genes como marcadores
moleculares preditivos de resposta à quimioterapia
neoadjuvante com doxorrubicina e ciclofosfamida em
pacientes com câncer de mama**

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

Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barros Filho, Mateus de Camargo

Expressão de grupos de genes como marcadores moleculares preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ciclosfosfamida em pacientes com câncer de mama / Mateus de Camargo Barros Filho. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1. Neoplasias da mama 2.Terapia neoadjuvante 3.Doxorubicina 4.Resistência a medicamentos 5.Expressão gênica 6.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 7.Análise discriminante

USP/FM/SBD-139/09

“A verdadeira sabedoria consiste em
saber como aumentar o bem-estar do
mundo”.

(Benjamin Franklin)

*Dedico este trabalho a todas as pacientes que
participaram do estudo*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Mateus de Camargo Barros e Anna Elizabeth Avalloni de Camargo Barros pela educação, sustento e confiança. Tenho muita sorte de ter herdado seus genes, apesar de reclamar de ser peludinho e baixinho (que fique claro que eu os culpo por pura brincadeira).

Ao meu irmão Daniel de Camargo Barros, que apesar das imensas diferenças, admiro muito sua inteligência e ambição, e à minha irmã Marília de Camargo Barros pelo cuidado, preocupação e compartilhamento de confidências.

À minha namorada Silvia Sakurai, por criar sentido e eliminar qualquer remorso de erros que cometi na minha vida, pois essa combinação de caminhos nos uniu. Também por me acompanhar durante esse tempo de mestrado e contribuir, principalmente psicologicamente, para o desenvolvimento do trabalho.

À Dra Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, por me aceitar como aluno e me dirigir ao mundo acadêmico, pelo qual me identifiquei e por exigir muuuuuuito da minha capacidade. Também pelo respeito, ótima orientação e inspiração para pesquisa.

À Dra Maria Lucia Hirata Katayama, uma pessoa insubstituível e de extrema importância no LIM24 (*workaholic*, no lado bom do conceito), presente em momentos criativos de muitos projetos e exercendo um papel também na vida pessoal de seus alunos. Foi a primeira pessoa que me orientou (trabalho de conclusão de curso na graduação) e com um empenho colossal. Outra grande inspiração que considerarei pelo resto de minha vida.

À Dra Mitzi Brentani, pela oportunidade que recebi de fazer parte do grupo de pesquisa em oncologia, pelo qual se dedica há muito tempo com muita sabedoria e produtividade.

Ao Dr Roger Chammas, coordenador do programa de pós-graduação do programa de Oncologia e a todos de seu grupo de adesão celular, Andréa, Claudia, Guilherme, Lara, Mara, Rafael, Renata, Silvina, Tarcisio, entre outros.

À Dra Patrícia Bortman Rozencham, minha primeira conexão ao grupo Mama do Lim24 e a outras residentes da “Casa Grande”, Dra Rosimeire Roela, Dra Flávia Mangone, Dra Fátima Pasini, Dr Igor Snitkovisky e Dra Natália Bromberg.

Aos meus companheiros de bancada e de “Senzala”, Cíntia Milani, Adriana Priscila Trapé, Suzana Terumi Honda, Karen Cristina Sant’Anna Brunialti, Karina Augusto Escobar, Paulo Del Valle, Lílian Barbeta, Laura Tojeiro Campos, Bruno Ferencz Papp Cadima, Yuri Urata, Carla Pinheiro, Elen Pereira Bastos, Simone Crestoni Fernandes e Arthur Willian Alvarenga. E a todos que deixaram o laboratório durante esse tempo, Ticiane, Renata, Cristina, Leonardo (Sagatiba), Juliana, Larissa, Marcos, duas Márcias, duas Camilas, três Simones, entre outros. Muito obrigado pela colaboração e amizade de todos. Desculpe-me por muitas vezes me refugiar no meu Ipod, mas é uma maneira mais eficiente e prazerosa de trabalhar. No entanto, prefiro escutar minhas músicas a ouvir discussões sobre o abdômen do Brad Pitt.

A Dra Shigueko e a todos do seu grupo de cultura celular.

A Maria José Benevides, Elizangela Dias e Rosilene Arruda pela dedicação e atenção a todos que necessitaram de sua ajuda e suporte burocrático.

À Maria Cristina Grandal pela ajuda nas ilustrações e amizade.

Aos funcionários Jair Cláudio, Willame Macedo e Ivonete Lima pelo ótimo trabalho, proporcionando um ambiente apropriado para o trabalho de todos.

À Dra Ana Paula Santana de Abreu pela coleta dos materiais biológicos e paciência com meus intermináveis pedidos de fichas de pacientes.

Às pacientes que nos proporcionaram material biológico para o estudo.

A dra Helena Brentani e seu grupo de Biotecnologia e Bioinformática pela assistência nas análises e por resolver diversas dúvidas de estatística.

Ao Dr Antônio Hugo Campos pelas análises anatomopatológicas e microdissecção manual de nossas amostras.

À minha professora de matemática da 5ª série por despertar meu interesse em biologia.

E por fim, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa de pós-graduação. E a fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	XVIII
RESUMO	XX
SUMMARY	XXIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	19
OBJETIVOS GERAIS	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	21
3.1 PACIENTES	22
3.2 TRATAMENTO	24
3.3 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA CLÍNICA	24
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	25
3.5 REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT).....	27
3.6 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	28
3.7 PCR EM TEMPO REAL	30
3.8 CURVA PADRÃO DE EFICIÊNCIA	33
3.9 CONDIÇÃO DAS REAÇÕES DE RT-PCR EM TEMPO REAL	33
3.10 ESCOLHA DOS GENES NORMALIZADORES APROPRIADOS.....	34
3.11 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE REAL TIME RT-PCR.....	37
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS.....	41
4.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTES	42
4.2 RELAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA.....	42
4.3 ESTABILIDADE DOS GENES NORMALIZADORES	43
4.4 IMPORTÂNCIA DA ESCOLHA DE GENES NORMALIZADORES APROPRIADOS....	47
4.5 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES AVALIADOS POR CDNA <i>MICROARRAY</i> E RT-PCR EM TEMPO REAL.....	49
4.6 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE AMOSTRAS RESPONSIVAS E NÃO- RESPONSIVAS	50
4.7 PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADOS À RESPOSTA.....	51
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES	80
7 ANEXOS	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
9 APÊNDICE.....	121

LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS

Lista de Unidade

- °C graus Celsius
- g força de gravidade (aceleração centrípeta)
- M molar
- m² metro quadrado
- mg miligrama
- mL mililitro
- mm milímetro
- mM milimolar
- ng nanograma
- nM nanomolar
- nM nanômetro
- µL microlitro
- µM micromolar

Lista de Abreviaturas

- A Adenina
 - AC Adriblastina (doxorrubicina) e ciclofosfamida
 - ACTB Gene codificador da beta actina
 - AD Adriblastina (doxorrubicina) e docetaxel
 - BZRP Gene codificador do receptor periférico de benzodiazepina
 - C Citosina
 - CAPPesq Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
 - CDI Carcinoma ductal invasivo
 - cDNA DNA complementar
 - CLPTM1 Gene codificador da proteína transmembrana associada à fenda labial e palatina
 - Ct Ciclo limiar
 - Cy3-dCTP 5-Amino-propargil-2'- desoxicitidina'-trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy3 (verde)
-

- **Cy5-dCTP** 5-Amino-propargil-2'- desoxicitidina'-trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy5 (vermelho)
 - **DEPC** Dietilpirocarbonato
 - **DMSO** Dimetilsulfóxido
 - **DNA** Ácido desoxirribonucléico
 - **dNTP's** Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (desoxi-adenosina, desoxi-citidina, desoxi-guanosina e desoxi-timidina)
 - **DTT** Ditionitreitol
 - **EC** Estadiamento clínico
 - **ED** Escore discriminante
 - **ErbB2** Homólogo 2 do gene viral de leucemia eritroblástica (também conhecido por HER2/neu)
 - **et al.** E outros
 - **FN** Fator de normalização
 - **G** Guanina
 - **GH** Grau histológico
 - **GUSB** Gene codificador da beta glucuronidase
 - **HB4a** Linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia
 - **INCA** Instituto Nacional de Câncer
 - **LN** Linfonodos
 - **ln** Logaritmo natural
 - **MCF-7** Linhagem celular epitelial mamária derivada de efusão pleural
 - **MgCl₂** Cloreto de magnésio
 - **MTSS1** Gene supressor de metástase 1
 - **n** Número
 - **NOTCH1** Gene Notch homólogo 1, Translocação associada (*Drosophila*)
 - **NUP210** Gene codificador de nucleoporina (210kDa)
 - **ORESTES** do inglês *Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*
-

- **P** Nível de significância estatística
 - **pág.** Página
 - **pb** Pares de bases
 - **PCR** Reação em cadeia da polimerase
 - **PPIA** Gene codificador de Peptidilprolil isomerase A (ciclofilina A)
 - **PRSS11** Gene codificador de proteína serine protease 11
 - **r** Coeficiente de correlação
 - **RE** Receptor de estrógeno
 - **RECIST** do inglês *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*
 - **RNA** Ácido ribonucléico
 - **RNAi** RNA de interferência
 - **RNAm** RNA mensageiro
 - **RP** Receptor de progesterona
 - **RPL37A** Gene codificador de proteína ribossomal L37a
 - **RPLP0** Gene codificador de proteína ribossomal grande P0
 - **RT** Transcrição reversa
 - **SMYD2** Gene codificador de proteína contendo domínio SET e MYND 2
 - **T** Timina
 - **T/FAC** Tamoxifeno/Fluorouracil, Adriblastina e Ciclofosfamida
 - **TCLE** Termo de consentimento livre e esclarecido
 - **TP53** Gene codificador da fosfoproteína p53
 - **UDP** Uridina-difosfato
 - **UGT** UDP-glucuronil transferase
 - **XLHSTRF-1** Cadeia pesada da dineína axonemal 1
-

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	pág. 12
Distribuição tridimensional de tumores de acordo com a expressão do trio de genes MTSS1, PRSS11 e CLPTM1.	
Figura 2.	pág. 27
Fotografia de eletroforese em gel de agarose.	
Figura 3.	pág. 30
Comportamento da fluorescência do Sybr Green I	
Figura 4.	pág. 31
Emissão de fluorescência pelo sistema Sybr Green em função dos ciclos de amplificação.	
Figura 5.	pág. 32
Curva de desnaturação derivativa.	
Figura 6.	pág. 82
Curvas padrão de reações de RT-PCR em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.	
Figura 7.	pág. 45
Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M).	
Figura 8.	pág. 45
Determinação do número adequado de genes controles.	
Figura 9.	pág. 46
Expressão dos genes candidatos a normalizadores de acordo com a resposta ao tratamento.	
Figura 10.	pág. 48
Expressão dos genes alvos de acordo com a expressão individual de cada gene controle.	
Figura 11.	pág. 88
Distribuição dos valores de expressão gênica em relação à normalidade através das análises por PCR e cDNA <i>microarray</i> .	
Figura 12.	pág. 91
Expressão relativa dos genes estudados por cDNA <i>microarray</i> nas amostras responsivas e não-responsivas.	
Figura 13.	pág. 51
Expressão relativa dos genes estudados por RT-PCR em tempo real nas amostras responsivas e não-responsivas.	
Figura 14.	pág. 52
Distribuição tridimensional considerando os mesmos trios e amostras previamente analisadas por cDNA <i>microarray</i> .	

Figura 15.....	pág. 53
Distribuição tridimensional do grupo de validação biológica para os trios RPL37A+XLHSRF-1+NOTCH1 e RPL37A+XLHSRF-1+NUP210.	
Figura 16.....	pág. 92
Distribuição bidimensional de amostras de tumores de acordo com a expressão dos genes estudados em pares, analisadas através de PCR.	
Figura 17.....	pág. 54
Distribuição bidimensional de acordo com a expressão dos pares de genes RPL37A+PRSS11 e RPL37A+NOTCH1.	
Figura 18.....	pág. 56
Distribuição tridimensional dos grupos de amostras de acordo com a expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1.	
Figura 19.....	pág. 93
Distribuição tridimensional detalhada dos grupos de amostras de acordo com a expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1.	
Figura 20.....	pág. 58
Distribuição tridimensional dos grupos de amostras de acordo com a expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1, pela análise com cDNA <i>microarray</i> .	
Figura 21.....	pág. 59
Diagrama de decisões para a escolha do grupo de genes que melhor classificariam o grupo de validação técnica	
Figura 22.....	pág. 61
Distribuição das amostras de acordo com os escores discriminantes.	
Figura 23.....	pág. 62
Comparação entre os escores discriminantes das amostras responsivas e não-responsivas para os grupos estudados.	

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELAS

Tabela 1.	pág. 42
Comparação entre dados clínicos das pacientes dos grupos de validação técnica e biológica.	
Tabela 2.	pág. 43
Associação entre dados clínicos e resposta à quimioterapia (teste Exato de Fisher).	
Tabela 3.	pág. 87
Correlação entre valores de expressão relativa por cDNA <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real para diferentes genes normalizadores.	
Tabela 4.	pág. 49
Correlação entre valores de expressão relativa dos genes avaliados por cDNA <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real.	
Tabela 5.	pág. 55
Trios de genes de melhor classificação pela avaliação por RT-PCR em tempo real.	

QUADROS

Quadro 1.	pág. 13
Trios de genes classificadores de resposta à quimioterapia.	
Quadro 2.	pág. 23
Características das pacientes.	
Quadro 3.	pág. 29
Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.	
Quadro 4.	pág. 44
Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M).	

RESUMO

Barros MCF. *Expressão de grupos de genes como marcadores moleculares preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ciclofosfamida em pacientes com câncer de mama*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 151p

Pacientes com câncer de mama localmente avançado são submetidas à quimioterapia neoadjuvante na tentativa de reduzir a dimensão do tumor e aumentar a possibilidade da realização de uma cirurgia conservadora. Nosso grupo identificou previamente através da tecnologia de cDNA *microarray*, trios de genes, incluindo BZRP, CLPTM1, MTSS1, NOTCH1, NUP210, PRSS11, RPL37A, SMYD2 e XLHSRF-1, cuja expressão era capaz de prever a resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ciclofosfamida em pacientes com câncer de mama. No presente estudo, avaliamos se a expressão destes genes é reprodutível na identificação de pacientes responsivas e não-responsivas através de RT-PCR em tempo real, que representa uma técnica mais acessível. Avaliamos inicialmente amostras de 28 pacientes anteriormente estudadas (grupo de validação técnica = 23 responsivas e cinco não-responsivas) e a seguir um grupo de 14 novas pacientes (grupo de validação biológica = 11 responsivas e três não-responsivas). Dentre os trios de genes inicialmente identificados, a expressão de RPL37A + XLHSRF-1 + NOTCH1 e RPL37A + XLHSRF-1 + NUP210 classificou corretamente 86% (24/28) das amostras do grupo de validação técnica e 71% (10/14) das amostras do grupo de validação biológica, através de análise de classificação discriminante. Desse modo,

esses trios não demonstraram a mesma precisão em comparação com resultados de cDNA *microarray*. Uma nova análise combinatória foi realizada na procura do melhor modelo preditivo utilizando valores de expressão obtidos por RT-PCR em tempo real. Identificamos então um novo trio, composto pelos genes RPL37A, SMYD2 e MTSS1, cuja expressão classificou corretamente 93% das amostras do grupo de validação técnica (22/23 responsivas e 4/5 não-responsivas) e 79% do grupo de validação biológica (8/11 responsivas e 3/3 não-responsivas). Portanto, o teste apresentou 88% de sensibilidade e especificidade em detectar pacientes responsivas para o total de amostras analisadas. Ao verificarmos o poder de classificação do mesmo grupo de genes, utilizando os valores de expressão pela análise de cDNA *microarray*, observamos um resultado semelhante (91% de sensibilidade e especificidade em reconhecer as amostras responsivas). Dessa forma, demonstramos que o perfil de expressão gênica obtido com cDNA *microarray* é reproduzível através do uso de RT-PCR em tempo real. Um estudo integrando um maior número de pacientes e uma plataforma de cDNA *microarray* mais abrangente pode auxiliar na identificação de um modelo preditivo baseado em grupos de genes mais acurado para antever a resposta ao tratamento com quimioterapia baseada em doxorrubicina.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Terapia neoadjuvante 3.Doxorrubicina 4.Resistência a medicamentos 5.Expressão gênica 6.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 7.Análise discriminante

SUMMARY

Barros MCF. *Expression of gene groups as predictive molecular markers response to neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide in breast cancer patients* [Dissertation]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2009. 151p

Patients with locally advanced breast cancer are submitted to primary chemotherapy as an attempt to reduce tumor dimension and increase breast conserving surgery rates. Our group has previously identified through cDNA microarray technology gene trios, including BZRP, CLPTM1, MTSS1, NOTCH1, NUP210, PRSS11, RPL37A, SMYD2 and XLHSRF-1, whose expression was capable of predicting response to neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide in breast cancer patients. In the current study, it was evaluated whether expression of these genes is reproducible in the identification of responsive and non-responsive patients by real time RT-PCR, which represents a more accessible technique. We initially evaluated samples from 28 patients earlier studied (technical validation group = 23 responsive and 5 non-responsive) and subsequent to a new 14 patients set (biological validation group = 11 responsive and three non-responsive). Among the initially identified gene trios, RPL37A + XLHSRF-1 + NOTCH1 and RPL37A + XLHSRF-1 + NUP210 expression correctly classify 86% (24/28) samples from the technical validation group and 71% (10/14) samples from the biological validation group, through discriminant classification analysis. Therefore, these trios didn't demonstrate the same precision as compared with cDNA microarray results. A new

combinatorial analysis was also performed in search of the best predictive model using real time RT-PCR expression values. A new trio was identified, represented by RPL37A, SMYD2 and MTSS1 genes, whose expression correctly classified 93% samples from technical validation group (22/23 responsive and 4/5 non-responsive) and 79% samples from biological validation group (8/11 responsive samples and 3/3 non-responsive samples). Therefore, the test presented 88% sensibility and specificity in identifying responsive patients for all samples analyzed. By means of verifying the classification strength of the same gene group, using cDNA microarray expression values, we observed a similar result (91% sensibility and specificity in recognizing responsive samples). Thus, we demonstrated that gene expression profile obtained by cDNA microarray is reproducible through real time RT-PCR. A study integrating a larger number of patients and a more comprehensive cDNA microarray platform may help the identification of a more accurate predictive model based on gene groups to foresee response to doxorubicin-based chemotherapy treatment.

Descriptors: 1. Breast neoplasms 2. Neoadjuvant therapy 3. Doxorubicin 4. Drug resistance 5. Gene expression 6. Reverse transcriptase polymerase chain reaction 7. Discriminant analysis

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa a maior causa de morte por câncer entre as mulheres no Brasil. É o segundo tipo de câncer mais freqüente e o mais comum entre as mulheres, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres para 2008 e 2009. O estado de São Paulo apresenta a segunda mais alta taxa estimada de incidência de câncer de mama, de 73 casos para cada 100 mil mulheres. É relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência é crescente e progressiva. Menarca precoce, menopausa tardia, ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos ou nuliparidade são alguns exemplos de fatores de risco (Ministério da Saúde; INCA; 2007).

A mama é composta por um parênquima, constituído de ácinos, de onde o leite é secretado, por uma camada contínua de células epiteliais luminais, envoltas por uma camada de células mioepiteliais. Essa estrutura de dupla camada é encerrada na membrana basal e a matriz extracelular fornece sustentação estrutural. Este mesmo ambiente orienta as células epiteliais a estabelecerem a extremidade apical e basal numa superfície intacta e polarizada que mantém o seu estado diferenciado, sendo o contato físico regulado através da combinação de diversas junções aderentes (Bissell et al., 2002). No desenvolvimento e remodelamento mamário, assim como na origem e progressão do câncer de mama, há a participação de diversos fatores, como hormônios, fatores de crescimento, citocinas, moléculas de matriz extracelular e metaloproteases de matriz (Bissell & Radisky, 2001).

Acredita-se que o processo que dá origem ao câncer ocorre como modificações genéticas seqüenciais que levam a transformação progressiva de células normais em derivadas malignas (Vogelstein et al., 1988).

O carcinoma mamário dissemina-se por via linfática, pela corrente sanguínea e por extensão direta (Sherman & Hossfeld, 1993), sendo que em estágios mais avançados, as células tumorais invadem e colonizam outros tecidos, preferencialmente fígado, cérebro, ossos e pulmões (Lakhani et al., 1999).

Alguns marcadores moleculares são comumente utilizados como fatores prognósticos, como o receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e ErbB2 (também conhecido como HER-2/neu), classificando de modo molecular os tumores em três tipos básicos: Tumores que expressam receptores hormonais, tumores com amplificação de ErbB2 e tumores que não expressam estes marcadores (triplo-negativos). Essas classificações têm sido integradas ao tratamento das pacientes, ajudando a estratificar o risco de recidiva (Goldhirsch et al., 2001).

O tratamento do câncer de mama foi aperfeiçoado substancialmente durante as últimas décadas pelo uso de métodos cirúrgicos, tratamento hormonal, radioterapia e quimioterapia (Moore-Higgs, 2006; Goldhirsch et al., 2007).

Um dos fármacos mais ativos utilizado no tratamento do câncer de mama é a doxorrubicina, um inibidor de topoisomerase II da família das antraciclinas que induz quebras na fita dupla de DNA, inibindo sua replicação. Topoisomerasas são enzimas constitutivas essenciais para

numerosos eventos nucleares, como condensação cromossômica, separação de cromátides e redução do estresse causado pelo enovelamento da molécula de DNA durante a replicação e transcrição. A doxorubicina também é um agente intercalante, além de dar origem a radicais livres, contribuindo para sua citotoxicidade e substancial atividade anti-neoplásica (DeVita et al., 1997).

Outro fármaco utilizado no tratamento do câncer de mama é a ciclofosfamida, um agente alquilante do grupo das oxazoforinas, utilizada no tratamento de diversos tumores e algumas doenças auto-imunes. Após ser convertida em formas ativas pelo fígado, forma ligações cruzadas entre as bases guaninas do DNA, levando as células à morte (preferencialmente as células mitóticas) (DeVita et al., 1997).

O tratamento adjuvante, isto é, realizado após o tratamento cirúrgico definitivo, é utilizado rotineiramente em pacientes com câncer de mama localizado, com o objetivo de erradicar possíveis micrometástases, reduzindo a chance de recidiva tumoral e aumentando a sobrevida das pacientes. A poliquimioterapia adjuvante baseada em antraciclina reduz a taxa anual de morte por câncer de mama em 38% para mulheres com idade inferior a 50 anos e 20% para mulheres entre 50 e 69 anos de idade ao diagnóstico (EBCTCG, 2005).

Pacientes com câncer de mama localmente avançado são submetidas à quimioterapia neoadjuvante, isto é, antes da cirurgia definitiva, na tentativa de reduzir o tamanho do tumor e aumentar a possibilidade da realização de uma cirurgia conservadora (Mauriac et al., 1991). A quimioterapia

neoadjuvante baseada em doxorrubicina e ciclofosfamida fornece um benefício de sobrevida similar à quimioterapia adjuvante, com taxa de resposta objetiva de 60-80% e resposta patológica completa em cerca de 10% dos casos (Fisher et al., 1997b, Fisher et al., 1998).

As antraciclina têm demonstrado alta atividade antitumoral em uma variedade de cânceres, no entanto, danos cardíacos irreversíveis representam uma limitação ao uso de alta dose cumulativa (Safra et al., 2003). Já foi demonstrado que o tratamento adjuvante com um aumento da intensidade de dose total de doxorrubicina não aumenta a sobrevida livre de doença em um acompanhamento de cinco anos em relação à dose padrão, podendo sugerir que a medicação tem alvo saturável (Henderson et al., 2003). Além disso, observou-se a eficácia da inclusão de quatro ciclos de docetaxel após quatro ciclos de terapia neoadjuvante baseada em doxorrubicina, comparado com oito ciclos de tratamento baseado em doxorrubicina. Houve um aumento na taxa de resposta objetiva com a adição de docetaxel ao tratamento, enquanto a inclusão de mais quatro ciclos de antraciclina não aumentou a taxa de resposta patológica completa, sugerindo que o tumor residual pode ser resistente a ciclos adicionais da mesma medicação (Smith et al., 2002).

A resposta de tumores de mama a agentes quimioterápicos citotóxicos, como a doxorrubicina, varia significativamente em diferentes casos, onde uma pior resposta pode envolver mecanismos moleculares de resistência ao tratamento (Turton et al., 2001, Sakai et al., 2008). A resistência a drogas pode ser intrínseca por alterações genéticas ocorridas

durante a progressão tumoral e alternativamente, extrínseca, isto é, pela ação do agente ao induzir genes que permitem a sobrevivência ou seleção de clones resistentes (Pusztai & Hortobagyi, 1998; Kudoh et al., 2000).

A distribuição limitada do agente quimioterápico em tumores sólidos pode ser também um importante fator de resistência à quimioterapia. Alguns autores observam concentrações quase nulas dos agentes quimioterápicos nas regiões mais distais dos vasos, não atingindo parte das células tumorais viáveis, permitindo o novo crescimento da lesão (Durand, 2001; Primeau et al., 2005). A presença de células-tronco tumorais também tem sido relacionada com o aparecimento de recidivas locais, já que permanecem quiescentes, não sendo eliminadas durante a quimioterapia (Clarke, 2005; Berns, 2005; Shafee et al., 2008).

Vários mecanismos de resistência em tumores são conhecidos, e incluem a inativação do fármaco por membros da família de enzimas p450 (Martinez et al., 2008), hiper-expressão de genes codificadores de transportadores de membrana ABC (*ATP binding cassette transporters*), que promovem o efluxo de drogas para o meio extracelular (Loe et al., 1996; Huang et al., 2004; Calcagno et al., 2008), modificação na estrutura ou na expressão de alvos moleculares das drogas (Lee et al., 2007; Burgess et al., 2008; Zhang & Liu, 2008), evasão de apoptose, necrose e catástrofe mitótica (Mansilla et al., 2006), alteração de genes de reparo de DNA (Guo et al., 2008; Hiro et al., 2008) e de pontos de checagem de ciclo celular (Xiao et al., 2005).

Sendo assim, em parte das pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante o tumor não apresenta resposta objetiva ao tratamento. Além do mais, em outras pacientes ocorre progressão da doença com prejuízo para o tratamento clínico. Portanto, a identificação de marcadores preditivos de resposta à quimioterapia primária poderia ser altamente vantajosa.

Entre os fatores preditivos de resposta à terapêutica já utilizados, estão a expressão tumoral de receptores de estrógeno e progesterona, no caso de terapia hormonal (Harvey et al., 1999; Fisher et al., 1997a) e de HER2/neu, no caso da terapia com trastuzumab (anticorpo monoclonal contra HER2/neu) (Slamon et al., 2001). Alguns autores têm associado uma melhor resposta de tumores que hiper-expressam HER2/neu em terapia com antraciclinas. Isso se deve possivelmente pela co-amplificação de HER2/neu com TOP2A, gene codificador da topoisomerase II, proteína alvo das antraciclinas, por ocuparem o mesmo locus gênico (17q12) (Di Leo et al., 2001; Arriola et al., 2007; Chen et al., 2008; Zhang & Liu, 2008). No entanto, outros autores (Knuefermann et al., 2003; Li et al., 2005) acreditam que a hiper-expressão de HER2/neu pode conferir resistência à doxorrubicina e a outros quimioterápicos pela ativação constitutiva da via de sinalização PI3K/Akt, que se correlaciona com a sobrevivência celular.

Outras características do tumor primário podem ser fatores preditivos de resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante, entre eles, a ausência de expressão de receptores de estrógeno, histologia anaplásica e menor tamanho do tumor (Kuerer et al., 1999; Green et al., 2005).

Um campo de interesse é determinar a relação entre o perfil de expressão gênica tumoral e o prognóstico (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; van 't Veer et al., 2002; Paik et al., 2004; Buyse et al., 2006) e predição de resposta ao tratamento em câncer de mama (Chang et al., 2003; Bertucci et al., 2004; Folgueira et al., 2005; Hannemann et al., 2005, Zembutsu et al., 2009).

Vários autores buscam identificar marcadores prognósticos moleculares através da análise do perfil de expressão gênica. Perou et al. (2000) caracterizaram a variação de expressão gênica, através de cDNA *microarray* representando 8.102 genes, em um grupo de pacientes com câncer de mama, verificando diferenças entre subgrupos de tumores no perfil de expressão gênica. Isso permitiu agrupar os tumores em quatro subtipos: luminal-símile, basal-símile, HER-2/neu positivo e normal-símile. Sorlie et al. (2001) refinou e expandiu essas classificações, onde separou o subgrupo luminal-símile em A e B e correlacionou os diferentes subtipos com a evolução das pacientes, sendo basal-símile e HER-2/neu positivos os de pior prognóstico.

van 't Veer et al. (2002) utilizaram cDNA *microarray* para analisar amostras de tumores de mama de pacientes sem comprometimento linfonodal. Em um intervalo de cinco anos de acompanhamento, 44% das pacientes apresentaram metástase à distância. A comparação dos perfis de expressão gênica entre os grupos de mau e bom prognóstico identificou uma assinatura de expressão de 70 genes, que se correlacionava com a evolução clínica. Uma validação interna demonstrou acurácia de 83% na

identificação do prognóstico (65 de 78 pacientes). Outra confirmação foi realizada em um estudo retrospectivo utilizando pacientes sem comprometimento linfonodal e tratadas com quimioterapia adjuvante em um período de acompanhamento de 10 anos. O perfil de expressão dos 70 genes indicadores de prognóstico apresentou grande capacidade em prever tempo para aparecimento de metástases à distância e sobrevivência global (Buyse et al., 2006).

Outro grupo (Paik et al., 2004) identificou um conjunto de 16 genes, a partir de 250 genes candidatos em experimentos de busca de perfis de expressão gênica, que correlacionavam com recidiva de câncer de mama em 447 pacientes sem comprometimento linfonodal e com expressão de receptores hormonais. Estes 16 genes foram validados como fator prognóstico em uma população externa de 668 pacientes tratadas com tamoxifeno em um acompanhamento de 10 anos.

Alguns perfis de expressão gênica, identificados por diferentes autores (Perou et al. 2000; van de Veer et al. 2002, Ma et al., 2004; Paik et al. 2004, Chang et al. 2005) foram avaliados quanto ao poder prognóstico em 250 amostras de câncer de mama. Observou-se que os modelos apresentavam alto grau de concordância em prever a evolução das pacientes, indicando que diferentes grupos de genes identificam tumores de comportamento específico (Fan et al., 2006).

Outros autores buscam marcadores preditivos de resposta a tratamentos quimioterápicos. Chang et al. (2003) analisaram o padrão de expressão gênica de tumores de 24 pacientes em lâminas de cDNA

microarray representando 12.625 genes. As pacientes foram tratadas com quatro ciclos de docetaxel de modo neoadjuvante e a resposta foi avaliada. Os autores identificaram um painel de 92 genes cuja expressão foi fator preditivo de resposta à quimioterapia neoadjuvante com confiabilidade de 88%. Este perfil gênico foi capaz de classificar corretamente a resposta de seis pacientes consideradas responsivas ao tratamento, incluídas em um grupo de validação dos resultados. Entre os genes mais expressos em tumores sensíveis ao docetaxel, encontravam-se genes associados ao estresse, apoptose, adesão ou citoesqueleto, e em tumores resistentes, genes associados à tradução de proteínas, ciclo celular e transcrição do RNA.

Hannemann et al. (2005) tentaram classificar o perfil gênico de 31 amostras tumorais de pacientes tratadas com AC (doxorrubicina e ciclofosfamida) ou AD (doxorrubicina e docetaxel) por seis ciclos, segundo a resposta patológica completa (ausência de células malignas na amostra pós-quimioterapia). Para isto, utilizaram plataforma de cDNA *microarray* contendo 18.432 seqüências, entretanto não obtiveram sucesso em caracterizar um perfil gênico que agrupasse as pacientes segundo o tipo de resposta.

Por outro lado, Bertucci et al. (2004) analisaram a expressão gênica de 26 amostras de pacientes com carcinoma inflamatório, dos quais nove apresentaram resposta patológica completa após tratamento neoadjuvante com doxorrubicina. Neste caso, os pesquisadores utilizaram plataforma de cDNA *microarray* contendo 6.664 genes, identificando 85 genes

diferencialmente expressos entre os grupos de resposta e não-resposta através de uma análise supervisionada, que permitiu a classificação dos mesmos com confiabilidade de 85%. Observou-se em tumores com resposta patológica completa maior expressão de CDKN1B (p27), um inibidor de progressão do ciclo celular, bem como de genes que codificam quimiocinas, citocinas e receptores de citocinas (como CSF1R, CCL2, CCL3, MMP9), sugerindo um papel para o sistema imune da paciente na erradicação do tumor após a quimioterapia.

Para estabelecer um método de predição de resposta ao tratamento com docetaxel neoadjuvante, Zembutsu et al. (2009) analisaram o perfil de expressão gênica de 29 amostras de câncer de mama utilizando uma plataforma de cDNA *microarray* contendo 36.864 sondas. Oito pacientes apresentaram resposta parcial à terapia e foram comparadas com doze pacientes com doença estável ou progressiva. Nove genes foram selecionados dentre os diferencialmente expressos entre o grupo resposta e não-resposta que claramente separaram os grupos de amostras de acordo com a resposta ao medicamento, incluindo para nove novas amostras. Além do mais, foi desenvolvido um sistema de predição baseado em PCR para o uso na rotina clínica.

Nosso grupo procurou identificar pacientes que fossem responsivas ao esquema de quimioterapia neoadjuvante contendo doxorrubicina, ou seja, que apresentassem resposta objetiva ao tratamento (resposta parcial ou completa). A resposta ao tratamento foi avaliada em 51 pacientes, baseando-se nos critérios RECIST (Therasse et al., 2000), onde 42

pacientes foram classificadas como responsivas (redução $\geq 30\%$ da dimensão do tumor). Foram utilizadas lâminas de cDNA *microarray* contendo 4.608 ORESTES (*open reading frame expressed sequence tags*) para analisar o perfil de expressão gênica entre amostras sensíveis e resistentes ao tratamento. Noventa e cinco genes foram hipo-expressos e 133 genes foram hiper-expressos nas amostras não-responsivas em relação às responsivas. Foi também realizada uma busca de trios de genes que podiam separar graficamente (plano tridimensional) as amostras de acordo com a resposta, visando à maior distância entre os grupos. O trio composto pelos genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1, pode classificar todas as amostras do grupo de treinamento e 11/13 amostras do grupo de validação (Figura 1), parecendo um promissor marcador de resposta (Folgueira et al., 2005).

Figura 2. Distribuição tridimensional de tumores de acordo com a expressão do trio de genes MTSS1, PRSS11 e CLPTM1. O classificador azul separou corretamente todas as amostras do grupo de treinamento e 84,7% das amostras do grupo de validação.

Legenda: T = Grupo de treinamento; V = Grupo de validação; Sens = Amostras sensíveis; Res = Amostras resistentes. FONTE: Folgueira et al. (2005)

A expressão de outros trios de genes, além de MTSS1, PRSS11 e CLPTM1, também apresentaram poder de separação das amostras como demonstrado no quadro 1.

Quadro 3. Trios de genes classificadores de resposta à quimioterapia.

Gene 1	Gene 2	Gene 3	Propagação de Erro
*PRSS11	*CLPTM1	*MTSS1	0,039
*PRSS11	*SMYD2	*MTSS1	0,042
*XLHSRF-1	*NOTCH1	*RPL37A	0,042
*PRSS11	*BZRP	*MTSS1	0,043
XLHSRF-1	NCKAP1	PHLDA3	0,044
AP3M1	PRSS11	MTSS1	0,044
*XLHSRF-1	*NUP210	*RPL37A	0,045
PRSS11	VAPB	MTSS1	0,045
XLHSRF-1	RPL37A	TPM1	0,046
PRSS11	GCC1	MTSS1	0,047

LEGENDA:* Trios de genes avaliados no presente estudo.

FONTE: Folgueira et al. (2005)

Os trios formados pelos genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 e PRSS11, MTSS1 e SMYD2 foram analisados também em fatias de tumores de mama de cadelas tratadas *in vitro* com doxorrubicina em outro estudo de nosso grupo. No entanto, nenhuma classificação de acordo com a resposta (resposta = redução maior que 21,7% do número de células) foi obtida através da expressão destes grupos de genes para esses animais (Sobral et al., 2008).

Os genes que constituem os trios separadores apresentam funções diversas. O gene BZRP ou TSPO (*peripheral benzodiazepine receptor* ou *translocator protein* (18kDa)), que se mostrou mais expresso no grupo de amostras não-responsivas, codifica uma proteína com habilidade em se ligar

ao colesterol com grande afinidade (Li et al., 2001). Esse receptor parece estar envolvido em diversos processos biológicos, como biossíntese de esteróides (Gavish & Wiesman, 1997), fosforilação oxidativa mitocondrial (Taupin et al., 1991) e proliferação celular (Papadopoulos, 1993; Gavish et al., 1999). Beinlich et al., (2000) correlacionaram a maior expressão de BZRP com uma maior atividade mitótica em células de linhagens de câncer de mama. Este gene pode estar hiper-expresso em diversos tumores, como em glioma (Miettinen et al., 1995), hepatoma (Venturini et al., 1998), adenocarcinoma de cólon (Katz et al., 1990), adenocarcinoma colo-retal (Maaser et al., 2002) e carcinoma de esôfago (Sutter et al., 2002), sendo considerado um possível alvo para novas estratégias contra o câncer (Corsi et al., 2004).

O gene CLPTM1 (*Cleft Lip and Palate-Associated Transmembrane Protein-1*), que se apresentou hiper-expresso no grupo de amostras não-responsivas, não possui função específica conhecida e codifica uma proteína transmembrana (Yoshiura et al., 1998). No entanto, esse gene é homólogo ao gene CRR9 (*cisplatin-resistant ovarian tumor cell line*), que é mais expresso em células ovarianas resistentes à cisplatina (Yamamoto et al., 2001). A mutação do gene CLPTM1 pode ser um fator genético para fendas labiais, alveolares e palatinas não-sindrômicas (Turhani et al., 2005).

O gene MTSS1 (*Mammalian Metastasis Suppressor 1*) ou MIM (*Missing in Metastasis*) apresentou uma menor expressão nas amostras não-responsivas. Esse gene codifica um polipeptídeo que se liga em monômeros de actina, contribuindo para a montagem de filamentos de actina. Desse

modo pode ser importante na regulação da dinâmica do citoesqueleto e como consequência pode estar envolvido na modulação de interações célula-célula ou célula-matriz-extracelular, as quais são importantes para o comportamento invasivo e metastático (Nixdorf et al., 2004). MTSS1 é considerado um gene supressor de metástase, capaz de suprimir o potencial metastático em câncer de bexiga (Lee et al., 2002). Demonstrou-se que a hipo-expressão desse gene ocorre através de metilação das ilhas CpG de seu promotor em diversos tecidos e linhagens celulares de câncer (Utikal et al., 2006).

A família dos genes NOTCH (1, 2, 3 e 4) de receptores transmembranas, possui importante papel na sobrevivência e diferenciação celular (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). A ativação constitutiva intracelular de NOTCH já foi descrita em leucemias linfoblásticas (Ellisen et al., 1991) e tumores mamários de camundongos (Uyttendaele et al., 1996). Além do mais, demonstrou-se que NOTCH1 (*Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)*) inibe apoptose mediada por p53 em células epiteliais imortalizadas (Nair et al., 2003), apoptose mediada por dexametasona em timócitos (Jehn et al., 1999) e em células T (Deftos et al., 1998). O gene NOTCH1 parece estar implicado no mecanismo de quimio-resistência, pela inibição da via p53, através da via PI3K-Akt/PKB mTOR dependente (Mungamuri et al., 2006) e altos níveis de sua expressão associa-se com redução de sobrevida global de pacientes com câncer de mama (Reedijk et al., 2005). Sua expressão foi maior nas amostras não-responsivas.

NUP210 (*nucleoporin 210kDa*), também hiper-expresso nas amostras não-responsivas, codifica uma proteína de membrana integral, sendo um componente do complexo de poro nuclear (Couvalin & Worman, 1997), presumindo-se que ancoram os complexos de poros nucleares pelo envelope nuclear (Antonin et al., 2005). Sua expressão é limitada em certos tecidos durante a organogênese e é controlada de modo específico ao tipo celular (Olsson et al., 2004).

O gene PRSS11 ou HTRA1 (HtrA serine peptidase 1) foi hipo-expresso nas amostras não-responsivas. Ele codifica uma proteína serina protease 11 ou protease de proteína de ligação do fator de crescimento insulina-símile 5 (*insuline-like growth factor binding protein 5* – IGFBP5), podendo influenciar na atividade da via IGF, que estimula a proliferação e diferenciação de numerosos tipos celulares (Zumbrunn & Trueb, 1996). Recentemente foi classificado como gene supressor de tumor em vários tecidos (Baldi et al., 2002; Chien et al., 2004; Bowden et al., 2006). Demonstrou-se também potencial regulação de resistência *in vivo* ao paclitaxel e cisplatina em tumores gástricos e de ovários, correlacionando-se positivamente com resposta à quimioterapia (Chien et al., 2006). Recentemente tem sido acreditado que as proteínas virais HPV E6/7 estão associadas na regulação positiva pós-transcricional de PRSS11 (Clawson et al., 2008).

O gene RPL37A (*ribosomal protein L37a*) codifica um componente da subunidade ribossomal 60S, que parece participar na ligação de proteínas ribossomais e RNA ribossômico (Saha et al., 1993). Altos níveis de

expressão de RPL37A e outras proteínas ribossomais estão associados com astrocitomas de alto grau tumoral (MacDonald et al., 2007), enquanto que em nosso estudo apresentou-se menos expresso nas amostras não-responsivas.

O gene SMYD2 (*SET and MYND domain containing 2*) é altamente expresso em musculatura cardíaca esquelética, especialmente em embriões. A deleção desse gene em camundongos impede a maturação de cardiomiócitos e a formação do ventrículo direito, culminando na morte destes animais logo após o nascimento. A ausência da maturação deste tipo de fibra muscular parece estar relacionada à atividade de metilação ou acetilação/desacetilação de histonas (Tan et al., 2006). Demonstrou-se também um potencial papel oncogênico do gene SMYD2, que inibe a função supressora de tumor do gene TP53, pela metilação de lisinas específicas de TP53. Através da inibição de SMYD2 em ensaios funcionais, utilizando RNA de interferência, observou-se um aumento de apoptose mediado por p53 (Huang et al., 2006). Sua expressão encontrou-se maior nas amostras não-responsivas.

O gene XLHSTRF-1 ou DNAH1 (*dynein, axonemal, heavy chain 1*), hiper-expresso nas amostras não-responsivas, codifica uma proteína motora da classe das dineínas axonemais. Essa classe de proteínas fornece a força para movimentos ciliares e flagelares em células eucarióticas (Gibbons, 1995). Para elucidar a função desse gene, Neesen et al. (2001) nocauteou o gene homólogo de camundongo MDHC7 (*mouse dynein heavy chain*),

observando infertilidade nos camundongos machos e diminuição na frequência de movimento ciliar traqueal.

Alguns autores ressaltam a validação dos resultados de *microarray*, através de técnicas independentes de quantificação de RNAm (como RT-PCR em tempo real), que é um elemento essencial neste tipo de experimento (Brazma et al., 2001; Chuaqui et al., 2002). Já foi demonstrado que o perfil de expressão gênica obtido com cDNA *microarray* é reproduzível através do uso de RT-PCR, que representa uma técnica mais acessível de análise de expressão gênica. A combinação dessas duas técnicas oferece um poderoso sistema na procura de marcadores genômicos preditivos no laboratório clínico (Folgueira et al., 2005; Perreard et al. 2006).

Portanto, nosso objetivo foi avaliar através RT-PCR em tempo real se a expressão dos genes BZRP, CLPTM1, MTSS1, NOTCH1, NUP210, PRSS11, RPL37A, SMYD2 e XLHRSF-1 em conjunto podem classificar amostras de câncer de mama de acordo com a resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ciclofosfamida.

2 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Confirmar por RT-PCR em tempo real a expressão de grupo de genes como marcadores preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorrubicina e ciclofosfamida em pacientes com câncer de mama.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a estabilidade de expressão dos genes ACTB, GUSB, PPIA e RPLP0 como possíveis genes referência para a normalização de nossos ensaios de RT-PCR em tempo real no grupo de amostras de câncer de mama de pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante.
 2. Analisar através de RT-PCR em tempo real a expressão dos genes BZRP, CLPTM1, MTSS1, NOTCH1 NUP210, PRSS11, RPL37A, SMYD2 e XLHSRF-1 em amostras de pacientes com câncer de mama.
 3. Verificar se a expressão desses genes em conjunto possui poder classificatório de resposta à quimioterapia no mesmo grupo de amostras avaliados por cDNA *microarray* (análise retrospectiva) e em um novo grupo de amostras (análise prospectiva).
-

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 0743/07).

3.1 Pacientes

Pacientes com confirmação histopatológica de câncer de mama de idade entre 27 e 70 anos, tratadas em três centros de tratamentos de câncer do estado de São Paulo (Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, Hospital do Câncer A.C. Camargo e Hospital Amaral Carvalho) de janeiro de 2002 a novembro de 2008, concordaram em participar do trabalho e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Dentre as 44 pacientes cujo perfil de expressão gênica tumoral foi avaliado inicialmente por cDNA *microarray*, 34 ainda apresentavam material (RNA total) suficiente para a determinação por RT-PCR em tempo real. Destas, seis amostras apresentaram evidências de degradação de RNA e não foram incluídas na pesquisa.

Em seguida, um grupo constituído por 14 novas pacientes com características semelhantes foi incluído no estudo como um grupo de validação biológica dos resultados (Quadro 2).

Quadro 4. Características das pacientes.

Paciente	Id	Men	Ec	Tpré	Tpós	%Res	Hist	GH	RE	RP	p53	HER2	LN+	Classe
ib02	67	Pós	3a	62	30	52	DUC	2	+	-	-	+	-	R
ib03	58	Pós	3a	100	45	55	DUC	3	+	-	-	+	-	R
ib06	63	Pós	3b	80	47	41	DUC	3	+	-	-	-	-	R
ib09	44	Pré	3b	90	57	37	DUC	3	+	+	-	-	+	R
ib10	32	Pré	3a	300	104	65	DUC	3	-	-	-	-	NA	R
ib20	48	Pré	3a	89	30	66	DUC	2	+	+	-	-	+	R
ib21	54	Pós	3a	105	20	81	MED	2	+	+	-	-	-	R
ib22	43	Pré	3a	82	64	22	DUC	2	+	+	+	-	+	NR
ib24	56	-	2b	80	20	75	DUC	2	+	+	+	-	+	R
ib25	46	Pré	3a	120	50	58	DUC	3	-	-	+	+	-	R
ib33	61	Pós	3a	75	60	20	DUC	2	-	-	-	-	NA	NR
ib34	34	Pré	3a	65	30	54	LOB	2	+	+	-	-	+	R
ib36	51	-	3a	51	30	41	DUC	2	+	+	+	-	+	R
q06	64	Pós	3b	60	80	-33	PAP	1	+	-	+	-	+	NR
q18	64	Pós	3b	40	10	75	DUC	2	+	-	+	-	+	R
q28*	40	Pré	3b	85	20	76	DUC	1	+	+	-	-	+	NR
q32	65	Pós	2a	40	22	45	DUC	2	+	-	+	-	-	R
q44	49	Pós	3b	45	0	100	DUC	2	-	+	-	-	+	R
q47	46	Pré	2b	35	15	57	DUC	2	+	-	+	-	-	R
q48	55	Pós	2a	35	15	57	DUC	2	+	+	-	-	-	R
q104	67	Pós	3b	70	70	0	DUC	2	+	+	+	-	+	NR
q113	56	Pós	3b	35	10	71	LOB	2	+	-	+	-	+	R
q130	47	Pré	2a	30	15	50	DUC	2	+	+	+	-	+	R
q144	45	Pré	3a	55	25	55	APO	1	-	-	NA	NA	+	R
q164	58	Pós	3b	20	10	50	DUC	2	+	+	NA	-	+	R
q170	42	Pré	2a	50	20	60	DUC	1	+	+	NA	+	+	R
q183	47	Pré	4	55	35	36	DUC	NA	+	-	NA	+	NA	R
j11	42	Pré	3a	60	20	67	DUC	3	-	-	-	-	-	R
*1T	42	Pré	2b	40	50	-25	DUC	3	+	-	-	+	+	NR
*2T	55	-	3b	150	20	87	DUC	2	-	-	+	-	-	R
*3T	67	Pós	3a	65	10	85	DUC	3	-	-	+	-	-	R
*5T	55	Pós	3a	80	50	38	DUC	2	+	+	-	-	-	R
*6T	45	Pré	3a	75	20	73	LOB	2	-	+	+	-	+	R
*7T	52	Pós	3a	60	35	42	DUC	3	-	-	-	-	+	R
*8T	57	Pós	3a	90	10	89	DUC	2	-	-	-	+	-	R
*9T	40	Pré	2b	55	23	58	DUC	NA	-	-	-	+	-	R
*10T	67	Pós	3a	50	25	50	DUC	2	+	+	NA	+	NA	R
*17T	51	Pós	3a	80	50	38	LOB	NA	-	-	-	+	-	R
*19T	54	Pós	2b	80	35	56	DUC	2	+	+	NA	-	+	R
*20T	27	Pré	3a	110	38	65	DUC	3	-	-	+	-	-	R
*22T	70	Pós	2b	43	45	-5	LOB	NA	+	+	-	-	-	NR
*24T	60	Pós	3b	150	150	0	DUC	2	+	+	-	-	+	NR

Legenda: Id=idade; Men=status menopausal; Ec=estadiamento clínico; Tpré=dimensão do tumor primário em milímetros antes do tratamento; Tpós=dimensão do tumor primário em milímetros após o tratamento; %Res=Porcentagem de redução da lesão neoplásica; Hist=tipo histológico; GH=grau histológico; RE=receptor de estrogênio; RP=receptor de progesterona; p53=expressão de p53; HER2=hiper-expressão de HER-2; LN+=comprometimento linfonodal; DUC=carcinoma ductal invasivo; LOB=carcinoma lobular invasivo; MED=carcinoma medular, PAP=carcinoma papilífero; APO=carcinoma apócrino; R=resposta; NR=não-resposta; NA=não avaliado; * Validação Biológica; # Aparecimento de nova lesão linfonodal.

3.2 Tratamento

As pacientes foram tratadas com 60 mg/m² de doxorubicina e 600 mg/m² de ciclofosfamida a cada 21 dias, aproximadamente, em quatro ciclos, com exceção de uma paciente (q06) que apresentou progressão de doença e recebeu apenas três ciclos de quimioterapia, sendo encaminhada para a cirurgia.

A duração mediana da terapia foi de 70 dias para o grupo de validação técnica e 72 dias para o grupo de validação biológica, com uma dose mediana de 59,8 mg/m² de doxorubicina e 598 mg/m² de ciclofosfamida para o grupo de validação técnica e 59,4 mg/m² e 594,0 mg/m² para o grupo de validação biológica.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a duração do tratamento e dose dos medicamentos entre as pacientes do grupo de validação técnica e biológica (Mann Whitney; P=0,194 e P=0,659, respectivamente).

3.3 Avaliação de resposta clínica

Para avaliar a resposta ao tratamento foi utilizado o critério RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*). O diâmetro da lesão alvo no sítio primário foi mensurado antes e após cada ciclo de quimioterapia. O desaparecimento de toda a lesão foi definido como resposta completa. Pacientes que apresentaram redução menor que 30% da lesão alvo após o tratamento, tendo como referência o maior diâmetro, foram classificadas como não-responsivas, assim como o aparecimento de uma nova lesão

tumoral durante o tratamento quimioterápico (Therasse et al., 2000). A mediana do diâmetro da lesão foi de 61 mm com redução mediana de 55% após o tratamento para o grupo de amostras da validação técnica e 78 mm com redução mediana de 53% para as amostras de validação biológica.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a dimensão e percentual de redução do tumor primário para as pacientes do grupo de validação técnica e biológica (Mann Whitney; $P=0,218$ e $P=0,821$, respectivamente).

3.4 Extração de RNA total

As amostras de pacientes incluídas no grupo de validação biológica, provenientes de biópsias por agulha de tumores primários de mama antes da quimioterapia, apresentaram ao menos 80% de componente invasivo (análise histopatológica) ou foram manualmente microdissecadas para o estudo.

O aparelho Termovac (Telcolab Corporation) foi utilizado para pulverizar as amostras, mantendo-as congeladas por nitrogênio líquido. O RNA total das amostras foi extraído adicionando-se 1 mL do reagente TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA), uma solução monofásica de fenol e isoticianato de guanidina, como uma otimização do método de extração de RNA desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). As amostras foram homogeneizadas, incubadas em temperatura ambiente por cinco minutos, centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g e os sobrenadantes transferidos para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 μ L de

clorofórmio (Merck, AL). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas, incubadas por dez minutos em temperatura ambiente e novamente centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi retirado com cuidado, evitando a interfase, transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Merck, AL) e homogeneizado por inversão. As amostras foram incubadas por uma noite em freezer a -20°C. Após centrifugação por dez minutos a 12.000 g, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (ambos Merck, AL) duas vezes. As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação por cinco minutos a 7.500 g a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água DEPC. A concentração do RNA total de cada amostra foi determinada por leitura em espectrofotômetro Gene Quant pro (Amersham Biosciences, New Jersey, USA) em comprimento de onda de 260 nm. A qualidade da amostra foi verificada através da relação entre os comprimentos de onda 260/280 (relação acima de 1,6), avaliando contaminação por proteínas, 260/230, avaliando contaminação por sais e solventes orgânicos (relação acima de 1). A integridade do RNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, onde podemos verificar possíveis contaminações por DNA, degradações e a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S (ideal > 1,5), como exemplificado na figura 2. Esse procedimento foi inclusive utilizado

para reavaliar a integridade das amostras de RNA previamente analisadas por cDNA *microarray*.

Figura 3. Fotografia de eletroforese em gel de agarose. A figura ilustra as bandas 5S, 18S e 28S de duas amostras de RNA obtidas de tumores de mama. A relação ideal entre as bandas 28S (superior) e 18S (inferior) é de pelo menos 1,5, sem indicação de degradação ou contaminação por DNA.

Todas as amostras foram mantidas em -80°C para garantir a integridade do RNA.

3.5 Reação de Transcriptase reversa (RT)

O RNA total foi convertido em cDNA pela reação da transcriptase reversa, que consiste nas seguintes etapas:

Para cada amostra, completa-se o volume de 2 µg de RNA para 12 µl de água DEPEC. À solução, são adicionados 2,5 µM dos iniciadores oligo dT₁₂₋₁₈ (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, St. Giles, UK) e 0,5 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). As amostras são incubadas por cinco minutos em 65°C e em seguida por um minuto no gelo. São adicionados à amostra 1X de tampão super script III *First Strand Buffer* (Invitrogen), 5 mM de dietiltreitol (DTT) (Invitrogen) e 200 unidades da enzima super script III *Reverse Transcriptase*

(Invitrogen), voltando-se a incubar as amostras a 55°C por mais 45 minutos, onde ocorre a reação de transcrição reversa e síntese da primeira fita de cDNA. Para a inativação da enzima as amostras foram aquecidas a uma temperatura de 70°C por 15 minutos. A concentração final de cDNA foi considerada como se todo o RNA fosse convertido em cDNA (2 µg de RNA / 20 µl de volume final = 0,1 µg/µl ao final da reação). As amostras foram estocadas em -20° C até o uso.

3.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ACTB, GUSB, PPIA e RPLP0 (candidatos a genes normalizadores), BZRP, CLPTM1, MTSS1, NOTCH1, NUP210, PRSS11, RPL37A, SMYD2 e XLHSRF-1 (genes alvos que compõem alguns trios) foram desenhados a partir da sequência de RNAm do gene em questão contidos no site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide (Quadro 3), escolhendo a região de interesse para a confecção dos iniciadores, ou seja, uma região com a presença de um grande íntron (de preferência maior que 1.000pb) entre os éxons, para facilitar a detecção e dificultar a amplificação de DNA genômico. O desenho dos iniciadores foi feito com o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/pr.cgi>) e o alinhamento com outras seqüências foi verificada no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Para certificar que os iniciadores não iriam formar estruturas estáveis indesejadas (secundárias) utilizou-se o programa OligoTech version 1.00, Copyright (1995) (Oligos Etc. Inc. & Oligo Therapeutics Inc.).

Quadro 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

Símbolo do Gene	Número de Acesso do Banco de Genes	Seqüência dos Oligonucleotídeos Iniciadores	Tamanho do Produto	Temperatura de Anelamento
ACTB*	NM_001101	Direto 5' AGAAATCTGGCACCAACC 3' Reverso 5' AGAGGCGTACAGGGATAGCA 3'	188pb	60°C
GUSB*	NM_000181	Direto 5' GGTGGAGAGCTCATTTGGA 3' Reverso 5' CCTGGTTTCATTGGCAATCT 3'	160pb	60°C
PPIA*	NM_021130	Direto 5' CAAATGCTGGACCCAACACA 3' Reverso 5' TGCCATCCAACCACTCAGTC 3'	170pb	60°C
RPLP0*	NM_001002	Direto 5' GGCGACCTGGAAGTCCAAC 3' Reverso 5' CCATCAGCACCAAGCCTTC 3'	149pb	60°C
BZRP	NM_000714	Direto 5' GCCATACGCGTAGTTGAG 3' Reverso 5' CTTCTTTGGTGCCCGACA 3'	173pb	58°C
CLPTM1	NM_001294	Direto 5' GATGACAAAGGCGAACAGGT 3' Reverso 5' CTCTACGGCTTCCTGCTGAC 3'	153pb	60°C
MTSS1	NM_014751	Direto 5' CTACAGCACCCAGACAACCA 3' Reverso 5' GACAGAAGGCTTGGTGGAAG 3'	286pb	60°C
NOTCH1	NM_017617	Direto 5' CATATGATCCGTGATGTCC 3' Reverso 5' CAGTTGTGCTCCTGAAGAA 3'	149pb	58°C
NUP210	NM_024923	Direto 5' GGGCTTGTTCCAGTGTGAAT 3' Reverso 5' CCACTATTTGCTGCCTCAT 3'	199pb	58°C
PRSS11	NM_002775	Direto 5' GGACTGTCCATTGATGCTGA 3' Reverso 5' GGACTCCCAGACGTGATCT 3'	115pb	60°C
RPL37A	NM_000998	Direto 5' TTCTGATGGCGGACTTTACC 3' Reverso 5' GATCTGGCACTGTGGTTCCT 3'	95pb	58°C
SMYD2	NM_020197	Direto 5' TCAGTGGCTTTCAATTCCTG 3' Reverso 5' CCATGTGGTTGAAGCTAGGG 3'	155pb	60°C
XLHRSF-1	NM_015512	Direto 5' GCTGGGAAAAGTGGTTGATG 3' Reverso 5' TCTACGACAGCTGGGTCAAG 3'	171pb	58°C

Legenda: * gene normalizador, pb=pares de bases.

3.7 PCR em Tempo Real

O sistema de detecção por SYBR *Green* se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada SYBR *Green* I, que quando se intercala à dupla fita de DNA e é excitado por luz azul emite a luz verde (Figura 3).

Figura 4. Comportamento da fluorescência do Sybr Green I. A representação gráfica mostra o complexo DNA-Sybr Green I absorvendo a luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488$ nm) e emitindo a luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522$ nm).

Fonte: Klaus Hoffmeier, 2006

Durante os ciclos iniciais da reação de 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 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, representando a quantidade final de cada produto acumulado (Figura 4).

Figura 5. Emissão de fluorescência pelo sistema Sybr Green em função dos ciclos de amplificação. É demonstrado o padrão de amplificação de dois transcritos (mais e menos expressos) em duplicatas para a mesma amostra.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação. Nesta curva, analisa-se ao final da reação a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de fusão de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui uma temperatura de fusão específica, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes (Figura 5).

Figura 6. Curva de desnaturação derivativa. O gráfico demonstra a curva de dissociação de produtos de dois transcritos distintos após 40 ciclos de amplificação. Os picos representam a temperatura de desnaturação, onde ocorre a maior liberação das moléculas de Sybr Green e conseqüente queda de fluorescência.

Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização e atinge um limiar, no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. Este é um ponto definido que deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência da base (*background*). O limiar é definido no início da fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (cDNA) amplificadas pela reação. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar (Ct: *cycle threshold*). As amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde inicial) atingem o limiar mais precocemente e mostram valores de Ct mais baixos (Figura 4, pág. 31). Quando a eficiência da reação de PCR está

próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação.

3.8 Curva padrão de eficiência

A eficiência das reações de amplificação por PCR foi avaliada para cada dupla de iniciadores utilizados. Utilizamos cDNA da linhagem de células epiteliais mamárias humanas HB4a (doadas pelos Drs. Michael J. O'Hare e Alan McKay do Ludwig *Institute for Cancer Research*, Londres, Reino Unido) diluídos em concentrações seriadas de 40 ng, 20 ng, 10 ng e 5 ng. Os ensaios demonstraram eficiências próximas de 100% (92-110%), indicando que ao final de cada ciclo o transcrito molde é duplicado, com variação de cerca de 10%, que não interfere significativamente nos resultados obtidos. As curvas de dissociação apresentaram picos bastante definidos, demonstrando especificidade do produto amplificado (Figura 6, Anexo B).

3.9 Condição das reações de RT-PCR em tempo real

Para cada reação foram utilizados 20 ng de cDNA, 1X de tampão para PCR (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,2 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso), 0,25% de DMSO, 1 unidade de DNA polimerase Taq Platinum (Invitrogen), 0,01X de Sybr Green (Sigma, St. Louis, MO, USA). As reações foram preparadas em duplicatas e submetidas às condições adequadas de

temperatura em termociclador (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália).

Os tubos contendo as misturas foram submetidos à cerca de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguidos de anelamento de *primers* à fita molde em 58-60°C por 20 segundos e extensão de polimerização a 72°C por 20 segundos, após cinco minutos em 95°C para desnaturação inicial e termo-ativação da enzima Taq polimerase.

As amostras foram analisadas pelo programa Rotor-Gene 6 System (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália) e a média dos valores de ciclos limiares (Ct) das duplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse (variação entre as duplicatas menor que 1 ciclo limiar).

3.10 Escolha dos genes normalizadores apropriados

A análise de expressão gênica por meio de PCR em tempo real 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. No entanto grandes variações são observadas em diferentes amostras do mesmo tecido (Barber et al., 2005; Kagedal et al., 2007) e em diferentes condições de tratamento (Schmittgen & Zakrajsek, 2000, Valenti et al., 2006; Nishimura et al., 2008), podendo alterar expressivamente os resultados dependendo do normalizador utilizado.

Os genes ACTB, GUSB, RPLP0 e PPIA considerados constitutivos ou *housekeeping*, foram selecionados como possíveis normalizadores. Estes foram utilizados como genes normalizadores por Paik et al. (2004) no desenvolvimento do teste Oncotype DX[®] (teste que prediz recidiva em pacientes com câncer de mama LN- e ER+ tratadas por tamoxifeno), com exceção de PPIA, que foi incluso por apresentar expressão estável em outros estudos de nosso grupo (Benvenuti, 2008; Terumi, 2008).

A β -actina (ACTB) é uma proteína altamente conservada componente do citoesqueleto envolvida na motilidade, estrutura e integridade celular. A β -glucuronidase (GUSB) é uma hidrolase lisossomal envolvida na degradação de glicosaminoglicanas contendo ácido glucurônico. Peptidil-prolil isomerase A (PPIA) catalisa a isomerização cis-trans de peptídeos entre prolinas em oligopeptídeos e acelera a dobradura das proteínas. A proteína ribossomal grande P0 (RPLP0) compõe a subunidade 60S do ribossomo e apresenta propriedades ácidas ao contrário da maioria das outras proteínas ribossomais (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene>).

A amostra de menor Ct (maior expressão ou concentração) para cada dupla de *primers* testada foi igualada a 1, utilizando essa amostra como referência. O valor relativo de expressão dos genes normalizadores foi obtido através do modelo matemático de Pfaffl (2001). Esses valores foram analisados pelo programa geNorm (disponível em <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), que determina quais são os genes normalizadores mais estáveis em um conjunto de amostras de cDNA e calcula um fator de normalização da expressão gênica para cada amostra

com base na média geométrica dos valores obtidos para os diferentes normalizadores (Vandesompele et al., 2002).

A estabilidade dos genes normalizadores é determinada partindo do princípio de que dois genes normalizadores ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras de cDNA a serem analisadas, independente de quaisquer condições experimentais ou tipos celulares. O programa geNorm avalia a razão de expressão de cada gene normalizador em relação aos demais normalizadores sempre aos pares, o que permite a exclusão dos transcritos menos estáveis. A cada normalizador excluído, o programa automaticamente atribui um novo valor referente à estabilidade dos demais normalizadores nas amostras de cDNA. Esse processo ocorre diversas vezes até que permaneçam apenas os genes cujos níveis de expressão sejam os mais estáveis, determinando assim a combinação adequada de normalizadores a serem utilizados nas análises de PCR em Tempo Real. Preconiza-se a utilização mínima de três genes normalizadores estáveis para a obtenção do fator de normalização confiável. Para determinar a necessidade de utilizar mais de três genes normalizadores na análise dos dados de PCR em Tempo Real, recomenda-se fazer a inclusão seqüencial de outros genes normalizadores e avaliar o impacto dessa inclusão no fator de normalização. Se a inclusão do novo normalizador não alterar o coeficiente de variação, a inclusão do mesmo não é necessária. O valor de 0,15 pode ser estabelecido como um limiar, acima do qual a inclusão de um novo normalizador seria adequada para a obtenção dos fatores de normalização (Vandesompele et al., 2002).

3.11 Análise dos resultados de real time RT-PCR

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. Utilizamos uma diluição de cDNA de diversos tumores de mama como referência neste estudo. Para o cálculo de quantificação dos transcritos dos genes de interesse foi utilizada a fórmula proposta por Pfaffl (2001):

$$R = \frac{(E+1)^{\text{alvo}}^{\Delta Ct \text{ alvo}}}{(E+1)^{\text{normalizador}}^{\Delta Ct \text{ normalizador}}} \quad (1)$$

Onde:

E – eficiência de reação de amplificação.

alvo – transcrito alvo avaliado.

normalizador – transcrito utilizado como normalizador

ΔCt – diferença entre o Ct obtido para a amostra referência e o Ct obtido para a amostra em análise.

A eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para os transcritos alvos e os genes normalizadores pode ser calculado de acordo com a equação:

$$E = [10^{(-1/\text{SLOPE})}] - 1 \quad (2)$$

Onde *slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação dos Cts dos transcritos em função do log de diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência).

Como não houve grande variação na eficiência de amplificação para os *primers* utilizados, consideramos eficiência igual a 100% (exatamente uma duplicação a cada ciclo) em todos os casos ($E=1$).

Ao utilizar mais de um gene constitutivo na normalização das reações de PCR, utilizamos a média geométrica dos valores de expressão relativa (ou fator de normalização gerado pelo programa geNorm) dos genes constitutivos mais apropriados:

$$R = \frac{(E+1)^{\Delta Ct_{\text{alvo}}}}{\cancel{(E+1)^{\Delta Ct_{\text{normalizador}}}}} \quad (3)$$

↓

$$R = \frac{2^{\Delta Ct_{\text{alvo}}}}{FN}$$

3.12 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa SPSS (*Statistics Packet for Social Sciences*), versão 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Utilizamos o teste de Qui-Quadrado para estudar associações, de acordo com frequências (para comparar os grupos de amostragem estudados e dados clínicos em relação à resposta à quimioterapia), exceto quando o número de casos esperados fosse igual ou menor a cinco, utilizando-se neste caso o teste Exato de Fisher.

Para estudar a expressão gênica, transformamos os valores de expressão relativa em logaritmo natural (ln), no intuito de diminuir o impacto de valores extremos. Verificamos a distribuição dos valores das variáveis independentes estudadas (expressão de cada gene) através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk (apropriado para elementos de número menor que 50), para a escolha do teste estatístico adequado. A análise paramétrica foi escolhida apenas quando ambos os grupos comparados apresentaram distribuição normal ($P > 0,05$, pois a hipótese nula refere-se à assimetria da distribuição dos dados). A análise de correlação entre os dados obtidos através de cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real foi feita através do teste de correlação linear de Pearson (paramétrico) ou Spearman (não-paramétrico).

Para determinar a significância estatística da diferença de expressão entre as amostras responsivas e não-responsivas, assumimos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, em razão do pequeno número de amostras no grupo não-resposta ($n=5$).

Em todas as análises estatísticas a hipótese nula foi rejeitada quando o valor de P bicaudado equivalesse a $\leq 0,05$.

Para a busca de modelos preditores de resposta ao tratamento a partir da expressão tumoral dos genes foi desenvolvida uma análise de classificação linear discriminante (Duda et al., 1999). A análise representa a combinação linear das variáveis em estudo (expressão relativa transformada em ln) que melhor discrimina grupos definidos *a priori*, de modo que uma equação discriminatória de predição é elaborada. A análise define

coeficientes discriminantes, estabelecendo a importância relativa das variáveis independentes (como pesos beta utilizados em regressão linear múltipla) e uma constante que é somada ao final do cálculo.

A representação gráfica dos planos tridimensionais classificadores obtidos por análise linear discriminante foi elaborada de modo que ilustrasse a melhor separação gráfica obtida em relação à distância ao limiar traçado (média aritmética entre os centróides dos grupos responsivos e não-responsivos).

Para ajudar a estimar o quanto o modelo preditivo encontrado pode ser generalizado em um grupo de amostras independentes, aplicamos uma validação cruzada, pelo método *Leave-one-out*. A validação é realizada elaborando o algoritmo diversas vezes a partir dos dados, removendo a cada *round* uma amostra diferente, que é testada separadamente para a confirmação da classificação. O resultado representa a porcentagem de amostras adequadamente classificadas pelos múltiplos *rounds* de validação cruzada com as diferentes partições.

Por fim, os modelos classificadores encontrados foram também testados com um novo grupo de amostras (n=14) na tentativa de confirmar o poder preditivo em um conjunto independente de amostras (validação biológica).

4 RESULTADOS

4.1 Comparação entre os grupos de pacientes

Os dados clínicos das pacientes foram comparados entre o grupo de validação técnica e biológica, para verificar desta forma a homogeneidade entre os grupos. Observamos uma menor proporção de pacientes do grupo de validação biológica com imuno-expressão tumoral de receptor de estrógeno (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre dados clínicos das pacientes dos grupos de validação técnica e biológica.

Características	Validação Técnica	Validação Biológica	P
Pós-Menopausa	50% (13/26)	69% (9/13)	0,254 [#]
EC III	70% (21/28)	71% (10/14)	1,000*
CDI	82% (23/28)	79% (11/14)	1,000*
GH 3	22% (6/27)	36% (4/11)	0,432*
RE+	79% (22/28)	43% (6/14)	0,036*
RP+	50% (14/28)	43% (6/14)	0,690 [#]
p53+	46% (11/24)	42% (5/12)	0,473 [#]
HER2+	19% (5/27)	36% (5/14)	0,267*
LN+	64% (16/25)	38% (5/13)	0,133 [#]

Legenda: EC: estadiamento clínico; CDI: carcinoma ductal invasivo; GH 3: grau histológico 3; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; p53+: imunohistoquímica positiva para p53. HER2+: hiper-expressão de HER2; LN+: comprometimento linfonodal; [#]Teste de Qui-quadrado; *Teste Exato de Fisher.

4.2 Relação entre dados clínicos e resposta à quimioterapia

Os mesmos dados clínicos foram comparados de acordo com a resposta à quimioterapia (Tabela 2), não havendo nenhuma associação entre status menopausal, estadiamento clínico (EC III), grau histológico (GH 3), tipo histológico (CDI), presença de receptores hormonais (RE e RP),

hiper-expressão de HER2, imuno-expressão de p53 (p53+) e comprometimento linfonodal (LN+) com resposta ao tratamento para o total de amostras estudadas.

Tabela 2. Associação entre dados clínicos e resposta à quimioterapia (teste Exato de Fisher).

Características	Resposta	Não-Resposta	P
Pós-Menopausa	55% (17/31)	63% (5/8)	1,000
EC III	74% (25/34)	75% (6/8)	1,000
CDI	82% (28/34)	75% (2/8)	0,635
GH 3	25% (8/32)	33% (2/6)	0,644
RE+	62% (21/34)	88% (7/8)	0,233
RP+	44% (15/34)	63% (5/8)	0,455
p53+	43% (12/28)	38% (3/8)	1,000
HER2+	27% (9/33)	13% (1/8)	0,653
LN+	48% (15/31)	86% (6/7)	0,104

Legenda: EC: estadiamento clínico; CDI: carcinoma ductal invasivo; GH 3: grau histológico 3; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; p53+: imunohistoquímica positiva para p53. HER2+: hiper-expressão de HER2; LN+: comprometimento linfonodal.

4.3 Estabilidade dos genes normalizadores

Para avaliar a expressão dos genes alvos, inicialmente testamos a estabilidade de expressão de quatro genes candidatos a normalizadores (ACTB, GUSB, PPIA e RPLP0) nas 28 amostras de câncer de mama previamente analisadas por cDNA *microarray*. Todos apresentaram estabilidade adequada para a normalização dos genes-alvo (coeficiente de estabilidade menor que 1,5), sendo que o gene PPIA apresentou expressão mais estável (M=1,052) e ACTB menos estável (M=1,456) entre os testados (Quadro 4).

Quadro 4. Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M).

1.5	ACTB	GUSB	PPIA	RPLP0	FN
IB02	1.90E-02	1.66E-01	1.84E-01	2.60E-02	0.9049
IB03	2.40E-02	3.58E-01	3.95E-01	2.80E-02	1.4335
IB06	2.30E-02	6.20E-02	1.81E-01	3.40E-02	0.7902
IB09	7.00E-03	5.30E-02	1.35E-01	2.70E-02	0.4951
IB10	1.00E-02	1.04E-01	1.86E-01	3.00E-02	0.7126
IB20	1.10E-02	1.30E-02	4.80E-02	6.00E-03	0.2068
IB21	1.00E+00	9.69E-01	1.00E+00	1.00E+00	14.4050
IB24	6.00E-03	9.60E-02	1.53E-01	4.30E-02	0.6406
IB25	2.00E-03	2.01E-01	2.28E-01	1.20E-02	0.4702
IB34	6.60E-02	6.29E-01	2.52E-01	5.60E-02	2.2588
IB36	7.00E-03	5.36E-01	3.14E-01	2.70E-02	1.0904
Q18	3.10E-02	3.70E-02	1.16E-01	1.60E-02	0.5546
Q32	1.20E-01	2.47E-01	5.12E-01	1.46E-01	3.1500
Q44	2.00E-02	4.60E-02	6.40E-02	3.50E-02	0.5501
Q47	9.60E-02	3.75E-01	4.08E-01	9.70E-02	2.8208
Q48	1.10E-02	1.70E-02	3.30E-02	8.00E-03	0.2164
Q113	7.00E-03	8.00E-03	1.90E-02	6.00E-03	0.1298
Q130	3.70E-02	1.72E-01	3.61E-01	4.10E-02	1.4303
Q144	7.00E-02	1.68E-01	2.62E-01	4.60E-02	1.5842
Q164	3.70E-02	1.14E-01	1.08E-01	1.00E-02	0.6708
Q170	6.00E-03	2.60E-02	1.80E-02	3.00E-03	0.1391
Q183	6.20E-02	1.48E-01	1.29E-01	2.00E-02	1.0127
J11	1.05E-01	4.75E-01	5.90E-01	1.22E-01	3.5539
IB22	7.70E-02	1.90E-01	7.66E-01	1.86E-01	3.1023
IB33	2.90E-02	2.86E-01	5.68E-01	6.80E-02	1.9424
Q06	1.33E-01	2.66E-01	4.80E-01	9.50E-02	2.9098
Q28	2.16E-01	1.00E+00	9.86E-01	1.52E-01	6.1585
Q104	1.00E-02	1.60E-02	4.50E-02	5.00E-03	0.2000
M < 1.5	1.456	1.237	1.052	1.093	

Legenda: PPIA apresenta expressão mais estável (verde) individualmente (M=1,052) e ACTB é o mais variável (vermelho) (M=1,456) nas 28 amostras de tumores de mama testadas. O fator de normalização (FN) representa a média geométrica da expressão relativa dos quatro genes controles avaliados.

A melhor dupla indicada pelo programa foi PPIA e GUSB (M=0,812) (Figura 7), sendo considerado o conjunto mais adequado de genes normalizadores a ser utilizado em conjunto com RPLP0 (V2/3=0,324) (Figura 8). Entretanto apresentou variação maior que 0,150, que representa o limiar sugerido por Vandesomepele et al. (2002).

Figura 7. Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M). Cálculo para determinar o melhor par de genes controles, após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável até permanecer apenas a melhor dupla, indicando que PPIA + GUSB representa o melhor par de genes ($M=0,812$).

Figura 8. Determinação do número adequado de genes controles. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que o uso dos três genes de expressão mais estável (2/3) é o mais apropriado (GUSB + PPIA + RPLP0). A análise estima o número de genes mais apropriado através do impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização. Como a inclusão de ACTB aos demais confere um desvio padrão um pouco maior no fator de normalização em comparação ao uso apenas dos três recomenda-se apenas o uso de GUSB, PPIA e RPLP0.

A análise de estabilidade de expressão para os genes normalizadores através do programa geNorm verifica apenas homogeneidade entre o universo de amostras utilizadas. Fizemos um teste considerando um dos

quatro genes constitutivos como alvo e o restante como referência, de modo que todos fossem estudados como genes alvo. Observamos que o gene GUSB, apesar de apresentar expressão estável entre as amostras em geral, apresentava-se menos expresso nas amostras tumorais não-responsivas à quimioterapia em relação às responsivas (Figura 9A). Ao excluirmos o GUSB da normalização da expressão de ACTB, PPIA e RPLP0 não verificamos nenhuma expressão diferencial significativa e pouca variação entre os grupos comparados (Figura 9B).

Figura 9. Expressão dos genes candidatos a normalizadores de acordo com a resposta ao tratamento. **A.** Expressão normalizada de cada gene (ACTB, GUSB, PPIA e RPLP0) de acordo com a expressão dos três genes controles restantes (Ex: expressão de ACTB = ACTB/(Média Geométrica de GUSB, PPIA e RPLP0)). Podemos observar uma menor expressão de GUSB nas amostras não-responsivas (P=0,006). **B.** Expressão normalizada de ACTB, PPIA e RPLP0 após a exclusão de GUSB, demonstrando pouca variação de expressão destes genes entre os grupos comparados. O gráfico mostra a distribuição de todos os valores entre as barras, com exceção de *outliers* e valores extremos. P = teste de Mann-Whitney.

Este fato desclassifica GUSB para o uso como gene normalizador nesse estudo, pois a análise se tornaria tendenciosa para aumento de expressão dos genes de estudo nas amostras não-responsivas. Portanto utilizamos a média geométrica da expressão dos genes ACTB, PPIA e RPLP0 como fator de normalização para determinar a expressão relativa dos genes estudados.

4.4 Importância da escolha de genes normalizadores apropriados

Verificamos que a escolha dos genes utilizados na normalização de RT-PCR em tempo real pode alterar acentuadamente os resultados obtidos ao final da análise. Isso demonstra a importância do uso de múltiplos normalizadores, apesar do grande gasto de amostra. A análise de correlação entre as duas técnicas comparadas no estudo apresentou resultados diversos quando utilizamos diferentes genes normalizadores. O uso de GUSB como normalizador conferiu os resultados mais divergentes em relação aos demais (Tabela 3, Anexo C).

Observamos também que a expressão dos genes alvos normalizados pela expressão do gene GUSB apresentaram um aumento de suas respectivas expressões nas amostras não-responsivas quando comparado com a normalização pelos genes ACTB, RPLP0 e PPIA individualmente (Figura 10).

Figura 10. Expressão dos genes alvos de acordo com a expressão individual de cada gene controle. Os genes alvos estão dispostos horizontalmente enquanto os genes controles (ACTB, GUSB, PPIA e RPLP0) se dispõem verticalmente. Podemos observar que a normalização pelo gene GUSB confere os resultados mais discrepantes em relação à normalização pelos outros genes controles, apresentando na maioria dos casos uma maior expressão dos genes alvos nas amostras não-responsivas. P = teste de Mann-Whitney.

4.5 Correlação entre a expressão dos genes avaliados por cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real

Após a escolha dos genes ACTB, PPIA e RPLP0 em conjunto como normalizadores, verificamos se havia correlação entre os valores de expressão relativa normalizada, obtidos através de RT-PCR em tempo real e cDNA *microarray*. Para esta análise utilizamos amostras do grupo de validação técnica, que incluía 28 pacientes anteriormente estudadas por cDNA *microarray* (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre valores de expressão relativa dos genes avaliados por cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real.

	n	Correlação (Array x PCR)	
		r	P
BZRP	28	0,011	0,956 [#]
CLPTM1	28	-0,111	0,575 [#]
MTSS1	28	0,360	0,060 [#]
NOTCH1	28	0,109	0,579 [#]
NUP210	28	0,484	0,009*
PRSS11	28	0,408	0,031*
RPL37A	28	0,405	0,033 [#]
SMYD2	28	0,434	0,021*
XLHRSF-1	28	-0,099	0,616 [#]

Legenda: r = coeficiente de correlação; *Correlação de Pearson (paramétrica); [#]Correlação de Spearman (não-paramétrica). A distribuição dos valores de expressão gênica em relação à normalidade e o teste de Shapiro-Wilk podem ser observados na Figura 11 (Anexo D).

Os valores obtidos pelas duas técnicas de quantificação de RNAm apresentaram coeficiente de correlação significativamente positivo para os genes NUP210 (P=0,009), PRSS11 (P=0,031), RPL37A (P=0,033) e SMYD2 (P=0,021). Tendência de correlação positiva foi verificada para a expressão

do gene MTSS1 ($P=0,060$) e nenhuma correlação negativa significativa foi observada.

4.6 Expressão gênica diferencial entre amostras responsivas e não-responsivas

Como parte das amostras previamente analisadas por cDNA *microarray* não puderam ser estudadas por RT-PCR em tempo real (28/44), verificamos a diferença de expressão entre os grupos resposta e não-resposta dos genes estudados pela análise por cDNA *microarray* somente para as 28 amostras.

Verificamos que na nova análise os genes mantinham-se significativamente diferencialmente expressos, com exceção de SMYD2 ($P=0,384$) (Figura 12, Anexo E).

Em seguida, analisamos os resultados obtidos por RT-PCR em tempo real. Observamos expressão diferencial para o gene RPL37A ($P=0,011$) entre as amostras de acordo com a resposta ao tratamento, mostrando uma menor expressão nos tumores não-responsivos à quimioterapia com doxorrubicina. Contudo, não observamos diferenças significativas para a expressão dos demais genes (Figura 13).

Figura 13. Expressão relativa dos genes estudados por RT-PCR em tempo real nas amostras responsivas e não-responsivas. O gráfico mostra a distribuição de todos os valores entre as barras, com exceção de *outliers* e valores extremos. P = teste de Mann-Whitney.

4.7 Perfis de expressão gênica associados à resposta

Nosso primeiro passo foi tentar confirmar o poder preditivo da expressão de cinco trios de genes classificadores de resposta selecionados para o estudo (Quadro 1, pág.13), através de uma técnica mais acessível, isto é, RT-PCR em tempo real. Para isto, desenhamos planos tridimensionais, utilizando os valores de expressão de cada trio determinados por RT-PCR em tempo real, de forma que exibissem a maior distância entre os pontos representados pelas amostras de cada grupo

(responsivo e não-responsivo) ao limiar traçado, com base em análise linear discriminante (Figura 14). Dentre eles, o perfil de expressão de dois trios de genes, RPL37A+XLHSRF-1+NOTCH1 (Figura 14.D) e RPL37A+XLHSRF-1+NUP210 (Figura 14.E), determinou as melhores separações entre as amostras responsivas e não-responsivas em relação às amostras do grupo de validação técnica (86% das amostras classificadas corretamente).

Figura 14. Distribuição tridimensional considerando os mesmos trios e amostras previamente analisadas por cDNA *microarray*. O limiar (azul claro) representado para a separação dos dois grupos de amostras comparados (Resposta - verde; Não-resposta - vermelho) foi obtido através de análise linear discriminante a partir dos valores de RT-PCR em tempo real. **A.** O trio PRSS11 + MTSS1 + CLPTM1 classificou corretamente 18/28 (64%) amostras. **B.** O trio PRSS11 + MTSS1 + SMYD2 classificou corretamente 16/28 (57%) amostras. **C.** O trio PRSS11 +

MTSS1 + BZRP classificou corretamente 15/28 (54%) amostras. **D.** O trio RPL37A + XLHSRF-1 + NOTCH1 classificou corretamente 24/28 (86%) amostras. **E.** O trio RPL37A + XLHSRF-1 + NUP210 classificou corretamente 24/28 (86%) amostras.

Entretanto, os mesmos planos não conferiram boas classificações para o grupo de validação biológica (71% das amostras classificadas corretamente) (Figura 15).

Figura 15. Distribuição tridimensional do grupo de validação biológica para os trios RPL37A+XLHSRF-1+NOTCH1 e RPL37A+XLHSRF-1+NUP210. O limiar (azul claro) representado para a separação dos dois grupos de amostras comparados (Resposta - Verde; Não-resposta - Vermelho) foi obtido através de análise linear discriminante a partir dos valores de RT-PCR em tempo real. **A.** O trio RPL37A+XLHSRF-1+NOTCH1 classificou corretamente 10/14 (71%) amostras. **B.** O trio RPL37A+XLHSRF-1+NUP210 classificou corretamente 10/14 (71%) amostras.

Buscamos então novos grupos de genes cuja expressão determinasse modelos classificadores de maior exatidão, com base nos resultados obtidos por RT-PCR em tempo real. Decidimos até mesmo adicionar a expressão de GUSB à análise, pois se apresentou significativamente menor nas amostras não-responsivas em relação às responsivas para o grupo de validação técnica. Entretanto, a expressão deste gene não foi determinada nos ensaios de cDNA *microarray*, pois não se encontrava imobilizado na lâmina.

Inicialmente foram observadas as melhores combinações binárias (45 permutações possíveis) para a classificação das amostras do grupo de validação técnica (n=28) (Figura 16, Anexo F). Observamos através da expressão das duplas RPL37A+PRSS11 e RPL37A+NOTCH1 uma separação mais eficiente em relação aos trios anteriores (>86%), isto é, 89% das amostras (25/28) por meio de análise linear discriminante. Ao analisarmos o grupo de validação biológica, observamos que 61-71% (9-10/14) de amostras seriam corretamente separadas por RPL37A+NOTCH1 e RPL37A+PRSS11, respectivamente (Figura 17).

Figura 17. Distribuição bidimensional de acordo com a expressão dos pares de genes RPL37A+PRSS11 e RPL37A+NOTCH1. O limiar (azul claro) representa a divisão entre os grupos de amostras responsivas (verde) e não-responsivas (vermelho) obtido através de análise linear discriminante a partir dos valores de RT-PCR em tempo real. **A.** O par RPL37A+PRSS11 classificou corretamente 89% das amostras (25/28) do grupo de validação técnica e 71% (10/14) da validação biológica. **B.** O par RPL37A+NOTCH1 classificou corretamente 89% das amostras (25/28) do grupo de validação técnica e 64% (9/14) da validação biológica.

A seguir, uma nova análise combinatória foi realizada na procura do melhor trio classificador, utilizando valores de expressão obtidos por RT-PCR em tempo real, isto é, diferente daquelas anteriormente encontradas por cDNA *microarray* utilizando o total de 44 amostras. Decidimos incluir a expressão de RPL37A em todos os novos trios, pois apresentou o maior poder de separação individualmente (23/28), isto é, classificou corretamente 82% do grupo de validação técnica. Dentre as 35 possíveis combinações de trios com os nove genes restantes, foram escolhidas aquelas que proporcionaram melhor separação das amostras do grupo de validação técnica (n=28). A seguir, foi realizado um teste de validação cruzada (*leave-one-out*), para estimar o quanto o modelo preditivo encontrado pode ser generalizado em um grupo de amostras independentes (Tabela 5).

Tabela 5. Trios de genes de melhor classificação pela avaliação por RT-PCR em tempo real.

Trios	Validação técnica	Validação cruzada*
RPL37A+XLHRSF-1+GUSB	93% (26/28)	89% (25/28)
RPL37A+SMYD2+MTSS1	93% (26/28)	86% (24/28)
RPL37A+SMYD2+NOTCH1	93% (26/28)	86% (24/28)
RPL37A+SMYD2+GUSB	93% (26/28)	79% (22/28)

* *Leave-one-out cross-validation*

Por fim, testamos esses modelos em um novo grupo de amostras, como uma validação biológica dos resultados.

O trio RPL37A + SMYD2 + MTSS1 é o único composto apenas por genes cuja expressão apresentou correlação entre as duas técnicas

avaliadas (array x PCR). Este trio classificou corretamente 93% das amostras do grupo de validação técnica (22/23 responsivas e 4/5 não-responsivas) e 79% do grupo de validação biológica (8/11 responsivas e 3/3 não-responsivas) utilizando as mesmas coordenadas pré-estabelecidas, conforme ilustrado na Figura 18 (plano detalhado na Figura 19, Anexo G)

Figura 18. Distribuição tridimensional dos grupos de amostras de acordo com a expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1. O limiar de separação (azul claro) entre os dois grupos de amostras comparados (Resposta (R)=verde; Não-resposta (NR)=vermelho) foi obtido através de análise linear discriminante a partir dos valores de PCR em tempo real. O trio de genes ilustrado permitiu uma separação correta de 93% das amostras do grupo de validação técnica (22/23 responsivas e 4/5 não-responsivas), errando apenas as amostras ib19 e q06, e 79% do grupo de validação biológica (8/11 responsivas e 3/3 não-responsivas), errando as amostras 8T, 17T e 20T. Validação técnica=esfera; Validação biológica=cubo.

Portanto, o teste apresentou 88% de sensibilidade (relação entre o número de amostras corretamente classificadas como responsivas e

amostras verdadeiramente responsivas) e especificidade (relação entre o número de amostras corretamente classificadas e o número total de amostras avaliadas) em identificar as pacientes responsivas.

Os outros trios, RPL37A + XLHSRF-1 + GUSB, RPL37A + SMYD2 + NOTCH1 e RPL37A + SMYD2 + GUSB, classificaram corretamente 64%, 71% e 57% do grupo de validação biológica, respectivamente.

A análise do estudo anterior com os valores de cDNA *microarray* para as 44 amostras não havia identificado o trio RPL37A+SMYD2+MTSS1, possivelmente por apresentar menor acurácia preditiva em comparação com os demais trios. Para conferir o seu poder classificatório, utilizamos os valores de expressão obtidos pelo cDNA *microarray* das 31 amostras que compunham o grupo de treinamento do estudo anterior. Através de análise discriminante buscamos um plano separador a partir da expressão de RPL37A, SMYD2 e MTSS1. Obtivemos uma classificação adequada de 90% das amostras do grupo de treinamento (21/24 responsivas e 7/7 não-responsivas). Verificamos pela validação cruzada (*leave-one-out*) que 87% das amostras continuavam adequadamente classificadas (20/24 responsivas e 7/7 não-responsivas).

Ao aplicarmos o mesmo modelo para as 13 amostras do grupo de validação biológica do estudo inicial, conseguimos classificar corretamente 92% das amostras (11/11 responsivas e 1/2 não-responsivas). Logo, o teste apresentou 91% de sensibilidade (32/35) e especificidade (40/44) em reconhecer as amostras responsivas. Percebemos então um resultado muito similar ao determinado por RT-PCR em tempo real (Figura 20).

Figura 20. Distribuição tridimensional dos grupos de amostras de acordo com a expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1, pela análise com cDNA *microarray*. O limiar de separação (azul claro) entre os dois grupos de amostras comparados (Resposta (R) - verde; Não-resposta (NR) - vermelho) foi obtido através de análise linear discriminante. O trio de genes ilustrado permitiu uma separação correta de 90% das amostras do grupo de treinamento (21/24 responsivas e 7/7 não-responsivas), errando as amostras ib24, q44 e q113, e 92% do grupo de validação biológica (11/11 responsivas e 1/2 não-responsivas), errando a amostras ib1. Grupo de treinamento = esfera; Validação biológica = cubo.

Combinamos também outros genes ao trio RPL37A+MTSS1+SMYD2, na procura da separação mais eficaz das amostras do grupo de validação técnica, analisadas por RT-PCR em tempo real. O método seguido foi a adição seqüencial da expressão do gene que conferia o maior aperfeiçoamento ao modelo (validação técnica e/ou cruzada), até a adição do último elemento que contribuísse em uma melhoria do poder de classificação, conforme representado na figura 21.

Trio Base		RPL37A+SMYD2+MTSS1 93% / 86%										
Validação técnica/cruzada												
4º gene	BZRP	93% / 86%	CLPTM1	89% / 79%	GUSB	93% / 79%	NOTCH1	93% / 86%	NUP210	93% / 86%	PRSS11 93% / 89%	XLHSRF-1 93% / 82%
	Validação técnica/cruzada											
5º gene	BZRP	93% / 86%	CLPTM1	93% / 82%	GUSB	96% / 79%	NOTCH1	93% / 89%	NUP210	93% / 89%		XLHSRF-1 96% / 82%
	Validação técnica/cruzada											
6º gene	BZRP	89% / 86%	CLPTM1	93% / 82%	GUSB 96% / 93%	NOTCH1	86% / 82%	NUP210	96% / 86%			
	Validação técnica/cruzada											
7º gene	BZRP	96% / 89%	CLPTM1	96% / 82%			NOTCH1	96% / 86%	NUP210	93% / 86%		
	Validação técnica/cruzada											

Figura 21. Diagrama de decisões para a escolha do grupo de genes que melhor classificariam o grupo de validação técnica. Consideramos o aumento da precisão na classificação das amostras como um aperfeiçoamento do modelo, e, secundariamente, a validação cruzada. Partindo do trio RPL37A+SMYD2+MTSS1, adicionamos a expressão de PRSS11 como 4º gene (validação cruzada passou de 86% a 89%), seguido de XLHSRF-1 como 5º gene (validação técnica passou de 93% a 96%) e GUSB como 6º gene (validação cruzada passou de 82% a 93%). A inclusão da expressão dos demais genes não proporcionou mais nenhum aperfeiçoamento ao modelo.

O conjunto elegido por essa análise foi o sexteto composto por RPL37A, GUSB, SMYD2, XLHSTRF-1, MTSS1 e PRSS11, cuja expressão conferiu uma separação multidimensional de 96% das amostras do grupo de validação técnica (22/23 responsivas e 5/5 não-responsivas) através da equação:

$$\text{ED} = (\text{RPL37A} \times 1,823) + (\text{GUSB} \times 1,029) + (\text{SMYD2} \times -0,904) + (\text{XLHSTRF-1} \times 0,762) + (\text{MTSS1} \times 0,282) + (\text{PRSS11} \times -0,153) + 0,570 \quad (4)$$

Para a divisão dos grupos resposta e não-resposta, um limiar é estabelecido, representando a média aritmética entre os centróides, ou seja, média aritmética dos escores discriminantes (ED) de cada grupo (responsivo e não-responsivo), acima do qual considera-se a amostra como responsiva ($\text{ED} > -1,03$). O sinal negativo referente ao peso assume que um maior valor da variável (maior expressão do gene) direciona os escores discriminantes abaixo do limiar (-1,03), indicando que uma maior expressão do gene contribui para classificação das amostras como não-responsivas. Enquanto que o sinal positivo direciona os valores para cima do limiar, indicando que uma maior expressão do gene contribui para classificação das amostras como responsivas.

Verificamos pela validação cruzada (*leave-one-out*) apenas duas amostras incorretamente classificadas (22/23 responsivas e 4/5 não-responsivas). Ao analisarmos o grupo de validação biológica, foi possível

separar corretamente 79% das amostras (mesmas classificadas anteriormente pelo trio RPL37A+SMYD2+MTSS1).

Observamos desta forma, um modelo classificador com 88% (30/34) de sensibilidade e 90% (38/42) de especificidade em detectar pacientes responsivos para o total de amostras (Figura 22).

Figura 22. Distribuição das amostras de acordo com os escores discriminantes. Os escores discriminantes foram obtidos através da análise de RT-PCR em tempo real para os genes RPL37A, GUSB, SMYD2, XLHRSF-1, MTSS1 e PRSS11 para os grupos de amostras avaliados. A linha azul clara representa o limiar ($ED=-1,03$) gerado a partir da média aritmética dos dois centróides, abaixo da qual deveriam se encontrar todas as amostras não-responsivas e acima todas as amostras responsivas. A figura ilustra apenas quatro erros de classificação dentre as 42 amostras estudadas, uma para a validação técnica (q18) e três para a validação biológica (3T, 17T e 20T).

Não foi possível testar o algoritmo classificador definido pelos seis genes para as 44 amostras com os valores de cDNA *microarray*, pois a plataforma de hibridização (4.608 ORESTES) não continha a sonda para o gene GUSB.

Os escores elaborados pela análise linear discriminante com o sexteto RPL37A, SMYD2, MTSS1, XLHSRF-1, PRSS11 e GUSB (Equação 4, pág. 60) foram estatisticamente comparadas, onde observamos alta significância ($P < 0,001$) apenas entre os grupos de amostras responsivas e não-responsivas para o grupo de validação técnica (Figura 23).

Figura 23. Comparação entre os escores discriminantes das amostras responsivas e não-responsivas para os grupos estudados. Os escores discriminantes foram obtidos através da análise de RT-PCR em tempo real para os genes RPL37A, GUSB, SMYD2, XLHSRF-1, MTSS1 e PRSS11 e ilustrados em gráfico Boxplot. **A.** O gráfico demonstra grande diferença entre os escores discriminantes das amostras responsivas ($> ED$) e não-responsivas ($< ED$) do grupo de validação técnica ($P < 0,001$). **B.** No grupo de validação biológica observamos uma diferença mais sutil dos escores discriminantes ($P = 0,243$). P = teste de Mann-Whitney.

5 DISCUSSÃO

O processo de resistência à quimioterapia é complexo e pode envolver diversos mecanismos simultaneamente. Nosso grupo identificou, através de cDNA *microarray*, trios de genes classificadores de resposta ao tratamento com doxorrubicina e ciclofosfamida em pacientes com câncer de mama (Folgueira et al., 2005). Alguns trios de genes eram constituídos por BZRP, CLPTM1, MTSS1, NOTCH1 NUP210, PRSS11, RPL37A, SMYD2 e XLHSRF-1. Procuramos avaliar a reprodutibilidade destes dados, em parte das amostras tumorais previamente utilizadas e em um novo grupo de amostras, por RT-PCR em tempo real, que representa uma técnica mais acessível em um laboratório clínico.

Inicialmente padronizamos a reação de RT-PCR em tempo real e testamos a estabilidade de expressão de quatro genes para determinar quais os melhores normalizadores. Para isto, fizemos uso do programa geNorm, como recomendado por diversos autores (Jung et al., 2007; Pérez et al., 2007; Robinson et al., 2007; Daud & Scott., 2008; Johansson et al., 2008; Lyng et al., 2008; Romanowski et al., 2008; Santos & Duarte, 2008).

Em nossa análise, todos os genes constitutivos avaliados apresentaram pequena variação de expressão. Os genes PPIA e RPLP0 mostraram as menores variações de expressão em nosso grupo de amostra, sendo utilizados em conjunto com ACTB para a normalização de nossos dados de PCR.

A expressão de Peptidil-prolil isomerase A (PPIA) já foi indicada para o uso como normalizadora de dados de RT-PCR em tecido humano mamário, onde foi verificada pouca variação de expressão em 21 amostras

de tumores primários de mama malignos e seis tumores benignos (McNeill et al., 2007). Este gene já foi descrito como bom normalizador para analisar expressão de células de carcinoma renal (Jung et al., 2007), células cardíacas (Pérez et al., 2007) e neurônios de hipocampo (Santos & Duarte, 2008).

Em relação à proteína ribossomal grande P0 (RPLP0), também já se observou expressão pouco variável em tumores invasivos de mama, tecido mamário normal e linhagens celulares de câncer de mama (Lyng et al., 2008). A estabilidade de sua expressão também foi observada entre amostras de neurônios do córtex pré-frontal (Johansson et al., 2007), células cardíacas (Pérez et al., 2007) e células cervicais infectadas por papilomavírus (Daud & Scott., 2008).

Quanto a ACTB, Morse et al. (2005) observaram pouca variação de sua expressão em linhagens celulares de câncer de mama com diferentes potenciais metastáticos. Outros autores também observaram estabilidade de expressão de ACTB em linhagens celulares pulmonares, tecido pulmonar (Nguewa et al., 2008) e neurônios de córtex pré-frontal (Johansson et al., 2007).

Sugerimos neste estudo uma maneira mais confiável de selecionar os genes constitutivos para a normalização de dados de RT-PCR em tempo real, analisando o maior número de genes constitutivos disponíveis nas amostras de estudo. Dessa forma é possível observar os genes de expressão mais estáveis em todo grupo de amostras com maior confiabilidade e também avaliar possíveis modulações de expressão desses

genes inter-classes. A análise individual de cada gene normalizador em relação aos demais pode indicar diferença de expressão gênica estatisticamente significativa entre os grupos de comparação. O efeito dessa variação pode interferir na análise dos outros genes constitutivos avaliados, no entanto é amenizada pelo uso de uma média geométrica envolvendo todos os genes constitutivos restantes para avaliar cada gene individualmente. Após a exclusão de genes com expressão diferencial significativa da normalização dos demais, podemos estimar com maior precisão a variação dos demais genes entre os grupos comparados.

O gene GUSB, descrito como um bom gene normalizador em amostras de leucemia linfocítica crônica (Abruzzo et al., 2005), leucemia mielóide crônica (Lee et al., 2006) e fígado com hepatite crônica (Romanowski et al., 2008), apresentou coeficiente de estabilidade de expressão dentro dos limites aceitáveis em amostras de câncer de mama por nós analisados. O seu uso em conjunto com PPIA e RPLP0 foi recomendado pelo programa geNorm para a normalização das 28 amostras do grupo de validação técnica. Entretanto, GUSB apresentou-se menos expresso nas amostras não-responsivas, quando utilizado como normalizadores os outros três genes referência (ACTB, PPIA e RPLP0). Logo, ao usarmos esse gene como normalizador observamos variação de expressão tendenciosa para maior expressão dos genes alvo nas amostras não-responsivas, originando resultados mais desiguais em comparação com o uso dos demais normalizadores isoladamente.

A glucuronidação é a maior via de detoxificação em todos os vertebrados. A formação de glucuronato é catalisada por uma família de UDP-glucuronil-transferases (UGTs), utilizando diversas substâncias xenobióticas e endobióticas como substrato (Senafi et al., 1994). O gene GUSB codifica uma hidrolase lisossômica (beta-glucuronidase) que quebra moléculas de ácido glucurônico de outras moléculas, revertendo o processo de glucuronidação (Shipley et al., 1993). De acordo com Albin et al. (1993), a ação de UDP-glucuronil-transferase e glucuronidase beta é cinco vezes mais baixa e seis vezes mais alta, respectivamente, em tumores de mama, quando comparados com seus respectivos tecidos adjacentes. Este dado sugere uma maior retenção de medicamentos metabolizados nesta via no tecido tumoral, possivelmente mais sensível a eles.

O processo de glucuronidação ocorre durante o metabolismo da doxorubicina, contribuindo para a sua inativação (Mross et al., 1988). Cowan et al. (1986) observaram um aumento da atividade de UDP-glucuronil-transferase em linhagem de células mamárias tumorais MCF-7 resistentes a doxorubicina, enquanto Ribrag et al. (1995) constataram que a expressão de beta-glucuronidase é menor em linfócitos quimio-resistentes a múltiplas drogas em comparação aos quimio-sensíveis. Esses dados estão de acordo com nossos resultados, sugerindo que GUSB pode contribuir em parte do processo de quimio-sensibilidade à doxorubicina, pela reversão da inativação mediada por glucuronidação.

Dessa forma, decidimos não utilizar esse gene como normalizador para as reações de RT-PCR em tempo real, fazendo uso apenas dos genes

ACTB, PPIA e RPLP0, que apresentaram estabilidade de expressão adequada e pouca variação entre os grupos de amostras responsivas e não-responsivas. Frente às evidências apresentadas de uma possível regulação de GUSB no processo de resistência, optamos por analisar a expressão desse gene em conjunto com os demais genes alvos para a busca de modelos classificadores de resposta ao tratamento, embora GUSB não estivesse representado na plataforma de cDNA *microarray* previamente utilizada.

Ao compararmos os resultados obtidos pelo cDNA *microarray* com RT-PCR em tempo real verificamos correlação positiva significativa na expressão de quatro de nove genes avaliados (44,4%), isto é, NUP210, PRSS11, RPL37A e SMYD2, e uma tendência de correlação positiva para o gene MTSS1. Apenas dois genes (CLPTM1 e XLHRSF-1) apresentaram correlação negativa, porém não significativa.

Alguns autores observam correlações variadas quando analisam amostras idênticas entre as técnicas de cDNA *microarray* e RT-PCR. Chang et al. (2003) procuraram validar os seus dados de cDNA *microarray* através de uma correlação estatística com os valores de expressão gênica obtidos por RT-PCR em tempo real. Verificou-se um resultado semelhante ao nosso, obtendo coeficiente de correlação positivo para 13/15 genes (87%), sendo que seis deles (40%) apresentavam correlação significativa. Um estudo desenvolvido pelo nosso grupo avaliou por cDNA *microarray* amostras pareadas de tumores de mama antes (biópsia) e após (tumor residual) o tratamento com doxorrubicina e ciclofosfamida. Ao tentarmos confirmar

através de RT-PCR em tempo real a expressão de oito genes selecionados, vimos que 4/8 (50%) genes apresentaram correlação positiva significativa (Barros Filho et al., 2008). Folgueira et al. (2005) avaliaram o perfil de expressão gênica em amostras de câncer de mama através de cDNA *microarray* e ao determinar por RT-PCR em tempo real a expressão de alguns genes selecionados, observaram correlação significativamente positiva em 8/14 genes (57%) entre os ensaios. Dallas et al. (2005) estudaram 48 genes através de cDNA *microarray* e RT-PCR, procurando observar a correlação entre as duas técnicas. Obtiveram-se correlações estatisticamente significativas para 33/48 genes (69%). O mesmo autor enfatiza a importância em validar os resultados antes da interpretação dos dados de expressão gênica, pois encontrou anti-correlações em 13% dos genes avaliados. Chiu et al. (2005) procuraram confirmar os dados de cDNA *microarray* em um estudo com amostras de câncer colo-retal através de RT-PCR em tempo real. No entanto, considerou uma razão maior que dois entre a expressão de amostras tumorais e normais como concordância entre as técnicas, observada em 8/20 (40%) dos genes testados.

Alguns fatores podem contribuir para que alguns genes não apresentem concordância de expressão quando avaliamos por cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real. O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a reação de PCR em regiões distintas das sondas do *microarray* pode resultar na quantificação de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de *splicing* alternativo. Porém, nem sempre é possível desenhar um par de *primers* que consiga passar por todos os critérios

escolhidos e ainda se posicionar entre a região de interesse da sonda na lâmina de *microarray*. No entanto os oligonucleotídeos iniciadores para o gene CLPTM1 foram desenhados de modo que amplificassem uma região inserida dentro de sua respectiva sonda na lâmina de *microarray*. Mesmo assim observamos correlação negativa, embora não-significativa ($P=0,575$), entre os resultado de RT-PCR e cDNA *microarray*.

O cDNA *microarray* é uma técnica de quantificação de RNAm bastante distinta do PCR em tempo real. O cDNA *microarray* avalia a expressão global de milhares de transcritos em um único ensaio, e com frequência tem a finalidade de buscar genes candidatos e determinar perfis de expressão, enquanto o PCR em tempo real avalia a expressão de transcritos específicos em pequena escala, sendo usualmente utilizado em laboratórios clínicos e de pesquisa.

As duas técnicas apresentam diferentes princípios em relação ao método de detecção. No caso do cDNA *microarray*, é realizada a hibridização direta dos transcritos com seqüências complementares (sondas) na lâmina, quantificando-se a expressão pela leitura de fluorescências provenientes de citosinas conjugadas (Cy3-dCTP e Cy5-dCTP) nas amostras alvo e referência. A técnica requer maior cuidado experimental, pois envolve uma série de procedimentos laboratoriais de alta complexidade, que podem introduzir variações adicionais aos resultados obtidos, e refinada análise estatística dos dados, pois milhares de sondas são avaliadas em um único ensaio.

Para o RT-PCR em tempo real, a detecção é feita pela amplificação e aumento da emissão de fluorescência proveniente de um produto específico. Como uma variação de 1 Ct (*Cycle threshold*) ao final do ensaio representa o dobro ou a metade de transcritos iniciais, erros operacionais podem ser amplificados. Lembramos também que o limiar de segurança de variação entre duplicatas aceita por muitos laboratórios de pesquisa é igual a 1 Ct, ou seja, o valor de expressão pode representar a média entre dois valores de razão igual a dois. Este fator também pode ser responsável por parte da divergência encontrada em resultados obtidos para alguns genes entre as técnicas, levando-se em consideração também os diferentes preceitos seguidos pela normalização dos dados em ambas as técnicas.

Observamos que os genes NOTCH1 e XLHSRF-1 apresentaram as menores expressões (Cts elevados, próximos a 30) entre os genes avaliados por RT-PCR em tempo real e não tiveram correlação com os valores de cDNA *microarray*. Morrison et al. (1998) notaram que a sensibilidade do método de detecção pelo SYBR *Green I* é limitada quando se parte de um pequeno número de fitas-molde na amostra alvo, sugerindo o método de detecção por TaqMan (considerado mais específico e sensível). Entretanto Maeda et al. (2003) não encontraram diferenças significativas em termos de especificidade e sensibilidade entre os métodos de detecção por SYBR *Green* e TaqMan. Outros autores observaram resultados muito similares quando utilizaram as duas técnicas para o mesmo estudo (Ponchel et al., 2003; Hembruff et al., 2005). Portanto, acreditamos que o método de detecção utilizado tenha sido adequado.

Dentre os genes alvos avaliados por RT-PCR em tempo real apenas RPL37A apresentou expressão diferencial significativa entre as amostras responsivas e não-responsivas. RPL37A é um gene codificador de uma proteína ribossomal (proteína ribossomal L37a), curiosamente já utilizado como gene normalizador de reações de PCR em tempo real em tecido humano mamário (Kostadima et al., 2006). Esse fato enfatiza ainda mais a análise de possíveis variações de expressão dos genes candidatos a normalizadores entre os grupos comparados.

Alguns estudos sugerem que proteínas ribossomais também possuem funções extra-ribossômicas, inclusive em resistência a drogas. As proteínas ribossômicas L4 e L5 já foram descritas como mais expressas em linhagem celular humana de carcinoma de cólon resistente à doxorrubicina comparada com sua linhagem celular parental (Bertram et al., 1998). A proteína ribossomal L6 também se apresenta hiper-expressa em linhagem celular de câncer gástrico resistentes a múltiplas drogas, podendo regular negativamente a apoptose, através da inibição de Bax e indução de Bcl-2 (Du et al., 2005). Entretanto, nossos resultados indicaram uma menor expressão de RPL37A nos tumores de mama não-responsivos à quimioterapia.

O gene RPL37A apresentou as menores expressões em quatro de cinco amostras não-responsivas (q104, ib22, q06 e q28) entre todas as amostras avaliadas no grupo de validação técnica. Conseqüentemente, representou a base para todos os modelos separadores (duplas, trios e

sexteto), apresentando a maior importância para a obtenção do escore discriminante com o uso de seis genes (peso de 1,823).

Analizamos por RT-PCR em tempo real os mesmos trios de genes previamente identificados por cDNA *microarray*. A expressão dos trios RPL37A+XLHSRF-1+NOTCH1 e RPL37A+XLHSRF-1+NUP210 conferiram as separações mais claras entre as cinco combinações testadas, mesmo sendo formados apenas por dois genes que apresentaram correlação positiva significativa entre as técnicas de cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real (RPL37A e NUP210). Enquanto uma baixa classificação foi encontrada para o trio PRSS11, SMYD2 e MTSS1, mesmo sendo composto por genes que apresentaram correlação entre os valores de expressão obtidos pelas duas técnicas.

Avaliando outras possíveis combinações de genes incluindo RPL37A, as que melhor classificaram as amostras previamente estudadas por cDNA *microarray* de acordo com a resposta ao tratamento foi o trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1 e o sexteto RPL37A, GUSB, SMYD2, XLHSRF-1, MTSS1 e PRSS11 (93% e 96%, respectivamente), sendo que ambos conjuntos classificaram corretamente 79% das amostras incluídas no grupo de validação biológica.

O estudo de múltiplos genes na tentativa de estabelecer classificadores prognósticos em câncer de mama já foi desenvolvido com êxito por outro grupo, dando origem ao teste laboratorial Oncotype DX® (Paik et al., 2004). Neste caso, a expressão de um grupo de 16 genes foi avaliada em 447 amostras de tumores, provenientes de blocos de parafina, de

pacientes com câncer de mama sem comprometimento linfonodal e com expressão de receptor de estrógeno. A partir da expressão dos 16 genes, um algoritmo foi elaborado, apresentando alta sensibilidade em prever o prognóstico (recorrência tumoral à distância) dessas pacientes em um acompanhamento de 10 anos, validando esses resultados em um estudo clínico posterior (Habel et al., 2006).

Hess et al. (2006) desenvolveram modelos preditores multigênicos de resposta patológica completa à quimioterapia com paclitaxel, fluorouracil, doxorubicina e ciclofosfamida (T/FAC) em 82 pacientes (21 com resposta patológica completa e 61 com doença residual) a partir dos resultados obtidos por oligonucleotídeo *microarray*. A capacidade preditiva do melhor modelo classificador, composto por 30 genes e baseado em análise diagonal linear discriminante, foi re-avaliada em 51 novos casos (13 com resposta patológica completa e 38 com doença residual). O teste identificou corretamente 95% (39/41) das amostras. A reprodutibilidade do teste foi verificada em 31 amostras selecionadas (20 amostras do grupo treino e onze da validação biológica) havendo 97% de concordância em predição de resposta ao tratamento. Entretanto a confirmação dos resultados foi feita replicando o teste com a mesma plataforma de *microarray* ao invés do uso de uma técnica independente.

Este tipo de análise utilizando múltiplas variáveis é interessante na procura de algoritmos preditivos, pois pode representar uma somatória dos efeitos funcionais dos fatores estudados em relação ao processo de resistência intrínseca do tumor, certamente multifatorial e de difícil

caracterização molecular. Entretanto, o método é recomendado para uma amostragem de grande número, pois a adição de cada variável independente à equação provoca o aumento da complexidade do modelo estatístico (*overfitting*). Quando os graus de liberdade na seleção do parâmetro excedem o índice de informação dos dados, o modelo encontrado se torna arbitrário. Isso reflete na dificuldade de reprodução do modelo além dos dados que o determinaram (Kim et al., 2002; Lee, 2008). Neste caso, é necessária a adição de um maior número de amostras para uma classificação de maior reprodutibilidade.

Nosso estudo compreendia um número pequeno de amostras não-responsivas, portanto o uso de seis genes para gerar um modelo classificador não seria adequado, pois pode ser pouco representativo para a população. Isto se deve ao padrão complexo elaborado a partir de um número reduzido de casos (principalmente não-resposta). No entanto, essa limitação é comum, pela dificuldade em se obter um número extenso de amostras, principalmente quando avaliamos amostras frescas congeladas.

Dessa forma, consideramos o trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1 como o modelo de maior importância no estudo, já que alcançamos a mesma classificação do sexteto na validação biológica. Além do mais, os três elementos desse grupo apresentaram concordância entre as técnicas de cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real (correlação positiva significativa para RPL37A e SMYD2 e tendência de correlação positiva para MTSS1). Apesar deste trio não ter aparecido anteriormente na análise pelo cDNA *microarray*, demonstramos 91% de sensibilidade e especificidade em

reconhecer as amostras responsivas com os valores de expressão obtidos por cDNA *microarray*.

A expressão dos genes PRSS11, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A foram também estudados por nosso grupo em fatias de carcinoma de mama de cadelas tratadas *in vitro* com doxorrubicina. Porém, nenhuma combinação de trios entre estes genes, inclusive RPL37A, SMYD2 e MTSS1, apresentou poder de predição de resposta, considerando responsivas as amostras que apresentaram redução maior que 21,7% do número de células (Sobral, 2006; Sobral et al. 2008). Entretanto, o câncer de mama de cadelas apresenta muitas diferenças, inclusive histológicas, em relação ao de mulheres, o que se deve traduzir em expressão gênica diferencial entre ambas. Deste modo, é possível que o perfil de transcritos associados à resposta à quimioterapia seja outro. Além disso, a resposta foi avaliada após um curto período de tratamento *in vitro* (24 horas), e pode não refletir o que se observa *in vivo* por um período maior e de ciclos repetidos.

A expressão de SMYD2 demonstrou grande concordância entre as técnicas de cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real, pois apresentou coeficiente de correlação positivo significativo e maior expressão nas amostras não-responsivas (sem significância estatística em ambas técnicas). Apesar da pouca diferença de expressão entre as amostras, uma maior expressão do gene contribui para a classificação das amostras como não-responsivas.

A metilação de lisinas em domínios específicos de histonas pode tanto ativar como reprimir a transcrição através de modificações na

cromatina (Zhang & Reinberg, 2001). O gene supressor de tumor TP53 codifica uma das únicas proteínas não-histonas regulada por metilação (Chuikov et al., 2004). Huang et al. (2006) observaram a repressão da atividade de p53 como fator de transcrição pela metilação de lisina (Lys172) mediada por SMYD2. Ao inibir esse transcrito através de RNA de interferência (RNAi) verificou um aumento de apoptose induzida por p53. Isto sugere que SMYD2 pode ter ação oncogênica e mediar resistência pela inibição de morte celular por vias ligadas à p53.

Apesar de não apresentar expressão diferencial significativa, uma maior expressão de MTSS1 contribui para classificação das amostras como responsivas. O gene MTSS1 é considerado um gene supressor de metástase que participa na montagem de filamentos de actina. Sua regulação negativa associa-se com proliferação, perda de adesão e invasão (Nixdorf et al., 2004).

Ao verificar os dados clínicos das pacientes incorretamente classificadas pelo trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1, identificamos algumas particularidades que podem interferir na classificação. A paciente q06 apresentou tumor de mama de histologia rara (papilífero) e pouco estudada. A paciente 20T foi a mais jovem incluída no estudo (27 anos ao diagnóstico). Sabe-se que tumores de mama de pacientes jovens apresentam fenótipos distintos, inclusive de maior agressividade que os demais (Anders et al., 2008). Outras duas pacientes (ib09 e 17T) apresentaram resposta objetiva próxima ao limiar de 30%. É importante salientar que a medida das lesões utilizada no estudo foi feita através da palpação clínica, que é pouco sensível

e específica, verificando toda massa tumoral, que pode incluir componente *in situ*, fibrose e edema tecidual.

Um aspecto negativo do teste foi a classificação incorreta de quatro pacientes responsivas como não-responsivas, estimando dessa maneira que 12% das pacientes sujeitas ao teste seriam erroneamente previstas como não-responsivas. Estas pacientes seriam encaminhadas diretamente à cirurgia, quando na realidade reagiriam bem à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ciclofosfamida. Entretanto, duas dessas quatro pacientes apresentaram redução tumoral próxima de serem classificadas como não-responsivas, minimizando o impacto negativo destas falsas não-responsivas. Além do mais, a quimioterapia pós-cirúrgica (adjuvante) seria indicada para estas pacientes, não havendo prejuízo em termos de sobrevida global e livre de doença.

Buscamos neste estudo elaborar modelos classificadores de resposta de pacientes com câncer de mama ao esquema de quimioterapia neoadjuvante contendo doxorubicina de acordo com a expressão de grupos de genes. Foi possível obter a separação de grande parte das amostras do grupo de validação técnica através da expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1. No entanto, o padrão de expressão apenas dos três genes avaliados não demonstrou predizer com exatidão um processo tão complexo como a resistência à quimioterapia em um grupo independente de amostras. Porém, ao observarmos o poder de classificação do trio para todas as 42 amostras, verificamos 88% de sensibilidade e especificidade (30/34 e 37/42, respectivamente) do modelo preditivo.

Acreditamos que um estudo integrando um maior número de pacientes e uma plataforma de cDNA *microarray* mais abrangente pode ajudar na identificação de um modelo preditivo baseado em grupos de genes mais acurado para antever a resposta ao tratamento com quimioterapia baseada em doxorrubicina.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo demonstram a importância do uso de genes normalizadores com pouca variação de expressão entre o grupo de amostras avaliado e também entre as classes comparadas, sugerindo inclusive uma metodologia neste tipo de análise para uma normalização mais confiável.

O gene RPL37A se apresentou menos expresso nas amostras não-responsivas e seu uso em conjunto com SMYD2 e MTSS1 permitiu a separação de grande parte das amostras de acordo com a resposta ao tratamento. O teste apresentou 88% de sensibilidade e especificidade em detectar as pacientes responsivas.

A expressão de genes em conjunto, avaliada por RT-PCR em tempo real e análise linear discriminante, pode ser uma ferramenta útil na busca de fatores que podem prever a resposta de pacientes ao tratamento quimioterápico, podendo no futuro contribuir para uma melhor individualização do tratamento.

7 ANEXOS

ANEXO A - Curvas de eficiência

Figura 6. Curvas padrão de reações de RT-PCR em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. A - ACTB (Eficiência=1,10); B - GUSB (Eficiência=1,00).

ANEXO A (continuação) - Curvas de eficiência

Figura 6. (Continuação) C - PPIA (Eficiência=1,09); D - RPLP0 (Eficiência=1,08).

ANEXO A (continuação) - Curvas de eficiência

Figura 6. (Continuação) E - BZRP (Eficiência=0,92); F - CLPTM1 (Eficiência=1,07); G - MTSS1 (Eficiência=0,97).

ANEXO A (continuação) - Curvas de eficiência

Figura 6. (Continuação) H - NOTCH1 (Eficiência=1,05); I - NUP210 (Eficiência=1,09); J - PRSS11 (Eficiência=1,00).

ANEXO A (continuação) - Curvas de eficiência

Figura 6. (Continuação). K - RPL37A (Eficiência=1,04); L - SMYD2 (Eficiência=1,00); M - XLHSRF-1 (Eficiência =1,06).

ANEXO B - Correlação estatística entre as técnicas e genes controles para normalização

Tabela 3. Correlação entre valores de expressão relativa por cDNA *microarray* e RT-PCR em tempo real para diferentes genes normalizadores.

	ACTB*		GUSB*		PPIA*		RPLP0*		TODOS*	
	Pearson	Spearman	Pearson	Spearman	Pearson	Spearman	Pearson	Spearman	Pearson	Spearman
BZRP	r	0,087	0,048	0,154	0,056	-0,066	-0,204	-0,213	-0,245	-0,168
	P	0,661	0,808	0,434	0,778	0,737	0,299	0,277	0,209	0,393
CLPTM1	r	0,015	0,057	0,386	0,296	0,065	-0,108	-0,021	-0,113	-0,079
	P	0,939	0,774	0,043	0,127	0,742	0,585	0,917	0,568	0,691
MTSS1	r	0,388	0,388	-0,069	-0,064	0,145	0,172	0,319	0,302	-0,046
	P	0,041	0,041	0,728	0,747	0,463	0,382	0,098	0,119	0,815
NOTCH1	r	0,160	0,076	0,178	0,144	0,094	0,068	0,174	0,140	0,324
	P	0,415	0,702	0,366	0,465	0,633	0,729	0,375	0,479	0,093
NUP210	r	0,584	0,366	0,263	0,330	0,335	0,327	0,412	0,386	-0,276
	P	0,001	0,055	0,177	0,087	0,081	0,089	0,029	0,043	0,155
PRSS11	r	0,509	0,515	-0,083	-0,151	0,176	0,150	0,354	0,349	0,099
	P	0,006	0,005	0,675	0,444	0,370	0,446	0,065	0,069	0,616
RPL37A	r	0,254	0,222	-0,021	-0,071	0,394	0,360	0,513	0,532	0,309
	P	0,191	0,257	0,915	0,721	0,038	0,060	0,005	0,004	0,109
SMYD2	r	0,199	0,175	0,675	0,728	0,668	0,667	0,337	0,203	-0,079
	P	0,311	0,374	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,301	0,688
XLHSHF-1	r	0,070	-0,126	0,064	-0,062	0,033	-0,089	0,024	-0,151	0,173
	P	0,724	0,521	0,745	0,755	0,866	0,654	0,905	0,445	0,378

Legenda: * Genes controles utilizados na normalização dos dados de RT-PCR em tempo real.

ANEXO C - Distribuição de dados de expressão gênica

Figura 11. Distribuição dos valores de expressão gênica em relação à normalidade através das análises por PCR e cDNA *microarray*. Representação através de gráficos QQ-Plot, que representa o quantil de probabilidade esperado (**Valor normal esperado**) se a distribuição fosse normal em função dos valores encontrados (**Valor observado**) e teste de normalidade de Shapiro-Wilk (**P**) para os genes BZRP, CLPTM1 e MTSS1. O teste de correlação paramétrico (Pearson) é indicado apenas quando ambas as distribuições (PCR e *array*) são consideradas normais ($P > 0,05$).

ANEXO C (continuação) - Distribuição de dados de expressão gênica

Figura 11 (Continuação). Distribuição dos valores de expressão gênica em relação à normalidade através das análises por PCR e cDNA *microarray*. Representação através de gráficos QQ-Plot, que representa o quantil de probabilidade esperado (**Valor normal esperado**) se a distribuição fosse normal em função dos valores encontrados (**Valor observado**) e teste de normalidade de Shapiro-Wilk (**P**) para os genes NOTCH1, NUP210 e PRSS11. O teste de correlação paramétrico (Pearson) é indicado apenas quando ambas as distribuições (PCR e *array*) são consideradas normais ($P > 0,05$).

ANEXO C (continuação) - Distribuição de dados de expressão gênica

Figura 11 (Continuação). Distribuição dos valores de expressão gênica em relação à normalidade através das análises por PCR e cDNA *microarray*. Representação através de gráficos QQ-Plot, que representa o quantil de probabilidade esperado (**Valor normal esperado**) se a distribuição fosse normal em função dos valores encontrados (**Valor observado**) e teste de normalidade de Shapiro-Wilk (**P**) para os genes RPL37A, SMYD2 e XLHSRF-1. O teste de correlação paramétrico (Pearson) é indicado apenas quando ambas as distribuições (PCR e *array*) são consideradas normais ($P > 0,05$).

ANEXO D – Expressão diferencial com dados de cDNA *microarray*

Figura 12. Expressão relativa dos genes estudados por cDNA *microarray* nas amostras responsivas e não-responsivas. O gráfico mostra a distribuição de todos os valores entre as barras, com exceção de *outliers* e valores extremos. P = teste de Mann-Whitney.

ANEXO E – Planos bidimensionais

Figura 16. Distribuição bidimensional de amostras de tumores de acordo com a expressão dos genes estudados em pares, analisadas através de PCR. Podemos observar que as melhores separações entre amostras responsivas e não-responsivas nos gráficos bidimensionais apresentam a expressão do gene RPL37A em um de seus eixos. As duplas RPL37A + PRSS11 e RPL37A + NOCHT1 apresentaram as maiores separações entre os grupos resposta (verde) e não-resposta (vermelho) através de análise linear discriminante (limiares não ilustrados).

ANEXO F – Plano tridimensional detalhado

Figura 19. Distribuição tridimensional detalhada dos grupos de amostras de acordo com a expressão do trio RPL37A, SMYD2 e MTSS1. O limiar de separação (azul claro) entre os dois grupos de amostras comparados (Resposta (R) - verde; Não-resposta (NR) - vermelho) foi obtido através de análise linear discriminante a partir dos valores de RT-PCR em tempo real. O trio de genes ilustrado permitiu uma separação correta de 93% das amostras do grupo de validação técnica (22/23 responsivas e 4/5 não-responsivas), errando apenas as amostras ib19 e q06, e 79% do grupo de validação biológica (8/11 responsivas e 3/3 não-responsivas), errando as amostras 8T, 17T e 20T. Validação técnica = esfera; Validação biológica = cubo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abruzzo LV, Lee KY, Fuller A, Silverman A, Keating MJ, Medeiros LJ, Coombes KR. Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data. *Biotechniques*. 2005;38(5):785-92.

Albin N, Massaad L, Toussaint C, Mathieu MC, Morizet J, Parise O, Gouyette A, Chabot GG. Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res*. 1993;1;53(15):3541-6.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008;26(20):3324-30.

Antonin W, Franz C, Haselmann U, Antony C, Mattaj JW. The integral membrane nucleoporin pom121 functionally links nuclear pore complex assembly and nuclear envelope formation. *Mol Cell*. 2005;17(1):83-92.

Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MB, Jones RL, James M, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;106(2):181-9.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;284(5415):770-6.

Baldi A, De Luca A, Morini M, Battista T, Felsani A, Baldi F, Catricalà C, Amantea A, Noonan DM, Albini A, Natali PG, Lombardi D, Paggi MG. The

HtrA1 serine protease is down regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene*. 2002; 21(43):6684-8.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-95.

Barros Filho MC, Folgueira MAAK, Katayama MLH, Brentani H, Carraro D M, Netto MM, Barreta LANB, Mota LD, Barbosa EM, Caldeira JRF, Brentani MM: Gene expression of residual breast cancer after primary chemotherapy based on doxorubicin and cyclophosphamide [painel]. XI São Paulo Research Conference - *Medicina Molecular e Farmacogenética*; 2008 Setembro 18-20, São Paulo.

Beinlich A, Strohmeier R, Kaufmann M, Kuhl H. Relation of cell proliferation to expression of peripheral benzodiazepine receptors in human breast cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(3):397-402.

Benvenuti TT. *Influência de células epiteliais mamárias malignas na expressão gênica de células estromais originárias de linfonodo axilar comprometido ou não comprometido de pacientes com câncer de mama*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Berns A. Stem cells for lung cancer? *Cell*. 2005;121(6):811-813.

Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M. Overexpression of ribosomal proteins L4 and L5 and the putative alternative elongation factor

PTI-1 in the doxorubicin resistant human colon cancer cell line LoVoDxR. *Eur J Cancer*. 1998;34:731-6.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Lloriod B, Camerlo J, Tagett R, Tarpin C, Houvenaeghel G, Nguyen C, Maraninchi D, Jacquemier J, Houlgatte R, Birnbaum D, Viens P. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res*. 2004;64(23):8558-65.

Bissell MJ, Radisky D, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. 2002;70:537-546.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46-54. Review.

Bowden MA, Di Nezza-Cossens LA, Jobling T, Salamonsen LA, Nie G. Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103(1):253-60.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*. 2001;29(4):365-71.

Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, Hannon GJ, Lowe SW, Hemann MT. Topoisomerase levels determine

chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;1105(26):9053-8.

Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ; TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;6;98(17):1183-92.

Calcagno AM, Fostel JM, To KK, Salcido CD, Martin SE, Chewing KJ, Wu CP, Varticovski L, Bates SE, Caplen NJ, Ambudkar SV. Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. *Br J Cancer*. 2008;6;98(9):1515-24.

Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sørli T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver MJ. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(10):3738-43.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell. Gene Expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003;362(9381),362-9.

Chen SC, Chang HK, Lin YC, Hsueh S, Cheung YC, Leung WM, Tsai CS, Lo YF, Tsai HP, Shen SC, Chen MF. High pathologic complete response in HER 2-positive locally advanced breast cancer after primary systemic

chemotherapy with weekly docetaxel and epirubicin. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38(2):99-105.

Chien J, Aletti G, Baldi A, Catalano V, Muretto P, Keeney GL, Kalli KR, Staub J, Ehrmann M, Cliby WA, Lee YK, Bible KC, Hartmann LC, Kaufmann SH, Shridhar V. Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest*. 2006;(7):1994-2004.

Chien J, Staub J, Hu SI, Erickson-Johnson MR, Couch FJ, Smith DI, Crowl RM, Kaufmann SH, Shridhar V. A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene*. 2004;26;23(8):1636-44.

Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):437-43.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.

Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet*. 2002;32:509-14. Review.

Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, Barlev NA, Reinberg D. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*. 2004; 18;432(7015):353-60.

Clarke MF. A self-renewal assay for cancer stem cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;56(1):64-68.

Clawson GA, Bui V, Xin P, Wang N, Pan W. Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *J Cell Biochem.* 2008;1;105(1):81-8.

Corsi, L., Avallone, R., Geminiani, E., Cosenza, F., Venturini, I., Baraldi, M. Peripheral benzodiazepine receptors in potatoes (*solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Com.* 2004;313(1):62-66.

Couvalin JC, Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997;17(1):79-90.

Cowan KH, Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Myers CE. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(24):9328-32.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR - how well do they correlate? *BMC Genomics.* 2005;27;6(1):59.

Daud II, Scott ME. Validation of reference genes in cervical cell samples from human papillomavirus-infected and -uninfected women for quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(9):1369-73.

Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity.* 1998;9(6):777-86.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer – Principles and Practice of Oncology*. 5^aed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997.

Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan CH, Ries F, Gobert PH, Closon-Dejardin MT, Dolci S, Rouas G, Paesmans M, Lobelle JP, Isola J, Piccart MJ. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol*. 2001;12(8):1081-9.

Du J, Shi Y, Pan Y, Jin X, Liu C, Liu N, Han Q, Lu Y, Qiao T, Fan D. Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein I6 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(2):242-7.

Duda RO, Hart PE, Stork DG. *Pattern Classification*. 2^aed. New York: John Wiley; 2001.

Durand RE. Intermittent blood flow in solid tumours - an under-appreciated source of 'drug resistance'. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20(1-2):57-61. Review.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. Tan-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T-lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991;66(4):649-61.

Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;10:355(6):560-9.

Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese R G, Cruz A B, Jr, Fisher E R, Wickerham D L, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn J L, Lees A W, Dimitrov N V. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J. Clin. Oncol.*, 1997b;15: 2483-2493.

Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2672-85.

Fisher B, Osbourn CK, Margolese AG, Bloomer W. *Neoplasms of the breast*. Philadelphia. Lea & Febiger; 1997a.

Folgueira MAAK, Carraro DM, Bentrani H, Patrão DFC, Barbosa EM, Netto MM, Caldeira JRF, Katayama MLH, Soares FA, Oliveira CT, Reis LFL, Kaiano JHL, Camargo LP, Vêncio RZN, Snitcovsky IML, Makdissi FBA, Silva PJS, Góes JCGS, Bentrani MM. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(20):7434-43.

Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G., Weizman, A. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev.* 1999;51(4):629-650.

Gavish, M., Weizman, R., Role of peripheral-type of benzodiazepine receptors in steroidogenesis. *Clin Neuropharmacol.* 1997;20(6):473-481.

Gibbons IR. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1995;32(2):136-44. Review.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3817-27, Review.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol.* 2007;18(7):1133-44. Review.

Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, Cristofanilli M, Booser DJ, Puztai L, Rivera E, Theriault RL, Carter C, Frye D, Hunt KK, Symmans WF, Strom EA, Sahin AA, Sikov W, Hortobagyi GN. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol.* 2005;1;23(25):5983-92.

Guo W, Zhao YP, Jiang YG, Wang RW, Hong L, Fan DM. Upregulation of ZNRD1 Enhances Cisplatin Resistance in Human

Esophageal Cancer Cells by Regulation of ERCC1 and Bcl-2. *Tumour Biol.* 2008;22;29(3):188-94.

Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick NT, Greenberg D, Fehrenbacher L, Langholz B, Quesenberry CP. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res.* 2006;8(3):R25.

Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CA, Velds A, Wessels LFA, Loo C, Rutgers EJ, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005;23:3331-42.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1474-81.

Hembruff SL, Villeneuve DJ, Parissenti AM. The optimization of quantitative reverse transcription PCR for verification of cDNA microarray data. *Anal Biochem.* 2005;15;345(2):237-49.

Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Cooper MR, Hayes DF, Tkaczuk KH, Fleming G, Holland JF, Duggan DB, Carpenter JT, Frei E 3º, Schilsky RL, Wood WC, Muss HB, Norton L. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for

patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(6):976-83.

Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, Booser D, Theriault RL, Buzdar AU, Dempsey PJ, Rouzier R, Sneige N, Ross JS, Vidaurre T, Gómez HL, Hortobagyi GN, Puztai L. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4236-44.

Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M. Mechanism of resistance to chemoradiation in p53 mutant human colon cancer. *Int J Oncol*. 2008;32(6):1305-10.

Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*. 2006;444(7119):629-32.

Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadée W. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*. 2004;64(12):4294-301.

Jehn BM, Bielke W, Pear WS, Osborne BA. Cutting Edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol*. 1999;162(2):635-8.

Johansson S, Fuchs A, Okvist A, Karimi M, Harper C, Garrick T, Sheedy D, Hurd Y, Bakalkin G, Ekström TJ. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res*. 2007;1132(1):20-8.

Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2007;8:47.

Kagedal B, Farnebäck M, Håkansson A, Gustafsson B, Håkansson L. How useful are housekeeping genes? Variable expression in melanoma metastases. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(11):1481-7.

Katz Y, Eitan A, Gavish M. Increase in peripheral benzodiazepine binding sites in colonic adenocarcinoma. *Oncology*. 1990;47(2):139-42.

Kim S, Dougherty ER, Barrera J, Chen Y, Bittner ML, Trent JM. Strong feature sets from small samples. *J Comput Biol*. 2002;9(1):127-46.

Klaus Hoffmeier, 2006 disponível em:
http://en.wikipedia.org/wiki/Image:SYBR_Green_I_spectra.png

Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2003;22;22(21):3205-12.

Kostadima L, Pentheroudakis G, Fountzilas G, Dimopoulos M, Pectasides D, Gogas H, Stropp U, Christodoulou C, Samantas E, Wirtz R, Hennig G, Bafaloukos D, Arapantoni P, Kalofonos H, Papakostas P, Economopoulos T, Bamias A, Pavlidis N. Survivin and glycodeclin transcriptional activity in node-positive early breast cancer: mRNA expression of two key regulators of cell survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;100(2):161-7.

Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, Elkahloun AG, Bittner ML, Meltzer PS, Trent JM, Dalton WS, Chin KV. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res.* 2000;60(15):4161-6.

Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley SM, Sneige N, Buchholz TA, Ross MI, McNeese MD, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Singletary SE. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):460-9.

Lakhani SR, Chaggar R, Davies S, Jones C, Collins N, Odel C, Stratton MR, O'Hare MJ. Genetic alterations in "normal" luminal and myoepithelial cells of the breast. *J Pathol* 1999;189(4):496-503.

Lee JW, Chen Q, Knowles DM, Cesarman E, Wang YL. beta-Glucuronidase is an optimal normalization control gene for molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia. *J Mol Diagn.* 2006;8(3):385-9.

Lee KM, Cao D, Itami A, Pour PM, Hruban RH, Maitra A, Ouellette MM. Class III beta-tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraepithelial neoplasia. *Histopathology.* 2007;51(4):539-46.

Lee S. Mistakes in validating the accuracy of a prediction classifier in high-dimensional but small-sample microarray data. *Stat Methods Med Res.* 2008;17(6):635-42.

Lee YG, Macoska JA, Korenchuk S, Pienta KJ. MIM, potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia*. 2002;4(4):291-4.

Li X, Lu Y, Liang K, Liu B, Fan Z. Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005;7(5):589-97.

Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., Papadopoulos, V. Cholesterol binding at the cholesterol recognition interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3),1267-72.

Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer*. 1996;32A(6):945-57. Review.

Lyng MB, Laenkholm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer*. 2008;22;8:20.

Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT, Tran Y, Tran D, Tassin A, Amon P, Wang W, Wang W, Enright E, Stecker K, Estepa-Sabal E, Smith B, Younger J, Balis U, Michaelson J, Bhan A, Habin K, Baer TM, Brugge J, Haber DA, Erlander MG, Sgroi DC. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004;5(6):607-16.

Maaser, K., Grabowski, P., Sutter, A.P., Hopfner, M., Foss, H.D., Stein, H., Berger, G., Gavish, M., Zeitz, M., Scherubl, H. Overexpression of

the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(10):3205-9.

MacDonald TJ, Pollack IF, Okada H, Bhattacharya S, Lyons-Weiler J. Progression-associated genes in astrocytoma identified by novel microarray gene expression data reanalysis. *Methods Mol Biol.* 2007;377:203-22. Review.

Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;24;39(1):81-6.

Mansilla S, Bataller M, Portugal J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006;6(6):589-602. Review.

Martinez VG, O'Connor R, Liang Y, Clynes M. CYP1B1 expression is induced by docetaxel: effect on cell viability and drug resistance. *Br J Cancer.* 2008;12;98(3):564-70.

Mauriac L, Durand M, Avril A, Dilhuydy JM. Effects of primary chemotherapy in conservative treatment of breast cancer patients with operable tumors larger than 3 cm. Results of a randomized trial in a single centre. *Ann Oncol.* 1991;2(5):347-54.

McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol.* 2007;8:107.

Miettinen, H., Konone, J., Haapasalo, H., Helen, P., Sallinen, P., Harjuntausta, T., Helin, H., Alho, H. Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res.* 1995;55(12),2691-2695.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Câncer de mama. Disponível em: URL:http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=336. [2008 out 24].

Moore-Higgs GJ. Radiation options for early stage breast cancer. *Semin Oncol Nurs.* 2006;22(4):233-41. Review.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998;24(6):954-8.

Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, Gillies RJ. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2005;1;342(1):69-77.

Mross K, Maessen P, van der Vijgh WJ, Gall H, Boven E, Pinedo HM. Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J Clin Oncol.* 1988;6(3):517-26.

Mungamuri SK, Yang X, Thor AD, Somasundaram K. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53. *Cancer Res.* 2006;1;66(9):4715-24.

Nair P, Somasundaram K, Krishna S. Activated Notch1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway. *J Virol* 2003;77(12):7106-12.

Neesen J, Kirschner R, Ochs M, Schmiedl A, Habermann B, Mueller C, Holstein AF, Nuesslein T, Adham I, Engel W. Disruption of an inner arm dynein heavy chain gene results in asthenozoospermia and reduced ciliary beat frequency. *Hum Mol Genet.* 2001;10(11):1117-28.

Nguewa PA, Agorreta J, Blanco D, Lozano MD, Gomez-Roman J, Sanchez BA, Valles I, Pajares MJ, Pio R, Rodriguez MJ, Montuenga LM, Calvo A. Identification of Importin 8 (IPO8) as the most accurate reference gene for the clinicopathological analysis of lung specimens. *BMC Mol Biol.* 2008;17;9(1):103.

Nishimura M, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Ikeda M. Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mRNA expression of housekeeping genes in cultures of C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367(3):603-8.

Nixdorf S, Grimm MO, Loberg R, Marreiros A, Russel PJ, Pienta KJ, Jackson P. Expression and regulation of MIM (Missing in Metastasis), a novel putative metastasis supressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2004;215(2), 209-220.

Olsson M, Scheele S, Ekblom P. Limited expression of nuclear pore membrane glycoprotein 210 in cell lines and tissues suggests cell-type specific nuclear pores in metazoans. *Exp Cell Res.* 2004;292(2):359-70.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;30;351(27):2817-26.

Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocrinol Rev*. 1993;14:222-240.

Pérez S, Royo LJ, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodríguez A, Gómez E, Otero J. Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Mol Biol*. 2007;8:114.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.

Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, Mone M, Hansen H, Buys SS, Rasmussen K, Orrico AR, Dreher D, Walters R, Parker J, Hu Z, He X, Palazzo JP, Olopade OI, Szabo A, Perou CM, Bernard PS. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res*. 2006;8(2):R23.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;1;29(9):e45.

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003;3:18.

Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;15;11(24 Pt 1):8782-8.

Pubmed: disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene>> acesso em outubro de 2008.

Pusztai L, Hortobagyi GN. High-dose chemotherapy: how resistant is breast cancer? *Drug Resist Updat.* 1998;1(1):62-72.

Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCreedy DR, Lockwood G, Egan SE. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res.* 2005;65(18):8530-7.

Ribrag V, Massaad L, Janot F, Morizet J, Gouyette A, Chabot GG. Main drug-metabolizing enzyme systems in human non-Hodgkin's lymphomas sensitive or resistant to chemotherapy. *Leuk Lymphoma.* 1995;18(3-4):303-10.

Robinson TL, Sutherland IA, Sutherland J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115(1-2):160-5.

Romanowski T, Sikorska K, Bielawski KP. GUS and PMM1 as suitable reference genes for gene expression analysis in the liver tissue of patients with chronic hepatitis. *Med Sci Monit.* 2008;14(7):BR147-52.

Safra T. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Oncologist.* 2003;8 Suppl 2:17-24. Review.

Saha DP, Tirumalai PS, Scala LA, Howells RD. Human ribosomal protein L37a: cloning of the cDNA and analysis of differential gene expression in tissues and cell lines. *Gene.* 1993;132(2):285-9.

Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, Taniguchi T. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature.* 2008;451(7182):1116-20.

Santos AR, Duarte CB. Validation of internal control genes for expression studies: Effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 2008;86(16):3684-92.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods.* 2000;20;46(1-2):69-81.

Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-

glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J.* 1994;1;303(Pt 1):233-40.

Shafee N, Smith CR, Wei S, Kim Y, Mills GB, Hortobagyi GN, Stanbridge EJ, Lee EY. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 2008;68(9):3243-50.

Sherman CD, Hossfeld DK. Câncer de mama. I: Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosh FF. *Manual de oncologia clínica*. Trad da UICC. 5 ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1993.

Shipley JM, Klinkenberg M, Wu BM, Bachinsky DR, Grubb JH, Sly WS. Mutational analysis of a patient with mucopolysaccharidosis type VII, and identification of pseudogenes. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;52(3):517-526.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92.

Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, Ah-See AK, Eremin O, Walker LG, Sarkar TK, Eggleton SP, Ogston KN. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1456-66.

Sobral RA. Expressão de PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A em fatias de carcinoma de mama de cadelas e

correlação com resposta à doxorrubicina in vitro. [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Sobral RA, Honda ST, Katayama ML, Brentani H, Brentani MM, Patrão DF, Folgueira MA. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer. *Acta Vet Scand*. 2008;4;50:27.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.

Sutter, A.P., Maaser, K., Hopfner, M., Barthel, B., Graboswski, P., Faiss, S., Carayon, P., Zeitz, M., Scherubl, H. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human esophageal cancer cells. *Int J Cancer*; 2002;102(4):318-327.

Tan X, Rotllant J, Li H, De Deyne P, Du SJ. SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *PNAS*, 2006;103(8):2713-18.

Taupin, V., Herbelin, A., Descamps-Latscha, B., Zavala, F. Endogenous anxiogenic peptide, ODN-diazepam-binding inhibitor, and benzodiazepine enhance the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes. *Linfokine Citokine Res*. 1991;10(1-2):7-13.

Terumi SH. *Influência de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células mamárias malignas MDA-MB231 e MCF-7* [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(3):205-16.

Turhani D, Item CB, Watzinger E, Sinko K, Watzinger F, Lauer G, Ewers R. Mutation analysis of CLPTM 1 and PVRL 1 genes in patients with non-syndromic clefts of lips, alveolus and palate. *J Cranio-maxil Surg.* 2005;33(5):301-6.

Turton NJ, Judah DJ, Riley J, Davies R, Lipson D, Styles JA, Smith AG, Gant TW. Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. *Oncogene.* 2001;20(11):1300-6.

Utikal J, Gratchev A, Muller-Molinet I, Oerther S, Kzhyshkowska J, Arens N, Grobholz R, Kannookadan S, Goerdts S. The expression of metastasis suppressor MIM/MTSS1 is regulated by DNA methylation. *Int J Cancer.* 2006;119(10):2287-93.

Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development (Camb)*. 1996;122(7):2251-9.

Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, Balducci E, Vinante O, Lo Cascio V. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer*. 2006;6:49.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):34.

Venturini, I., Zeneroli, ML., Corsi, L., Avallone, R., Farina, F., Alho, H., Baraldi, C., Ferrarese, C., Pecora, N., Frigo, M., Katz, Y., Eitan, A., Gavish, M. Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 1998;47,139-142.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.

Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H. A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene*. 2005;24(8):1403-11.

Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(4):1148-54.

Yoshiura K, Machida J, Daack-Hirsch S, Patil SR, Asworth LK, Hecht JT, Murray JC. Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in family with cleft lip and palate. *Genomics*. 1998;54(2),231-40.

Zembutsu H, Suzuki Y, Sasaki A, Tsunoda T, Okazaki M, Yoshimoto M, Hasegawa T, Hirata K, Nakamura Y. Predicting response to docetaxel neoadjuvant chemotherapy for advanced breast cancers through genome-wide gene expression profiling. *Int J Oncol*. 2009;34(2):361-70.

Zhang J, Liu Y. HER2 over-expression and response to different chemotherapy regimens in breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008;9(1):5-9.

Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*. 2001;15(18):2343-60. Review.

Zumbrunn J, Trueb B. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett*. 1996;398(2-3):187-92.

9 APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: "Determinação dos genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 para validação da resposta ao tratamento quimioterápico com doxorubicina e associações no câncer de mama"

INFORMAÇÕES A(O) PACIENTE**INTRODUÇÃO :**

Este documento fornece uma descrição do tratamento do qual você está sendo convidada a participar. Também resume as informações atualmente disponíveis em relação às condutas a serem avaliadas.

A senhora está sendo convidada a participar de um estudo em pesquisa clínica. Os médicos deste Hospital estão estudando a biologia e evolução clínica do câncer de mama; e na tentativa de aprimorar métodos de tratamento do mesmo necessitam fazer uso da pesquisa clínica, instrumento pelo qual novas possibilidades de tratamento podem ser encontradas e questões a respeito da biologia do câncer podem ser respondidas.

Para decidir se aceita ou não participar desta pesquisa, a senhora precisa entender o suficiente sobre os riscos e benefícios para que possa fazer um julgamento consciente. Este processo é chamado de "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido".

Este formulário de consentimento contém informações sobre a pesquisa em estudo e será discutido com o seu médico. Uma vez compreendido o estudo e havendo interesse em participar do mesmo, será solicitada a sua assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido. A senhora receberá uma cópia para seu arquivo. Se a senhora julgar necessário, consulte outros profissionais (médicos ou não) antes de assinar este documento.

A pesquisa proposta é a seguinte: Determinação dos genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 para validação da resposta ao tratamento quimioterápico com doxorubicina e associações no câncer de mama.

OBJETIVO DO ESTUDO:

Determinar se os genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 estão envolvidos na resposta ao tratamento quimioterápico, do câncer de mama, com doxorubicina e avaliar possíveis associações desses genes associadas a essa neoplasias.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

O tratamento proposto é aquele utilizado para tratamento de pacientes com estágio III da doença e envolve várias modalidades terapêuticas: quimioterapia, cirurgia, radioterapia e hormonioterapia. Nesta pesquisa as pacientes receberão 4 ciclos de quimioterapia, a seguir serão submetidas a mastectomia (cirurgia para retirada da mama) e então mais aplicações de quimioterapia. Após o término da quimioterapia, realizarão radioterapia e somente aquelas pacientes cujos tumores expressarem receptores hormonais (um marcador de resposta ao tratamento) receberão hormonioterapia por 5 anos.

A quimioterapia pré-cirurgia será feita em ambulatório e repetida a cada 21 dias.:

A: Doxorubicina, dose 60 mg/m² associada a Ciclofosmida 600mg/m² (4 ciclos) + cirurgia.

PROVÁVEIS RISCOS / EVENTOS ADVERSOS:

A Doxorubicina + ciclofosfamida podem provocar alterações no exame no exame de sangue (mielossupressão) que podem fazer com que fiquem mais propensas a infecções a hematomas (manchas de sangue), irritação na boca dificultando a ingestão de alimentos, perda de cabelos, náuseas e/ou vômitos, diarreia, perda de apetite, febre e cistite (irritação da bexiga). Se o medicamento entrar em

contato com a pele, poderá ocorrer algum dano mas o seu médico e enfermeiras serão cuidadosos para evitar que isto ocorra. Após algumas infusões da Doxorubicina, podem ocorrer danos ao coração, no entanto o risco é muito baixo com as doses usadas neste estudo.

Informar o(s) Telefone(s) de contato e o Investigador

Caso ocorra qualquer dúvida ou alteração entrar em contato com Dr. Edison Mantovani Barbosa ou Dra. Ana Paula Santana de Abreu. Telefone: 3474-4222.

PROVÁVEIS BENEFÍCIOS:

Muito embora seja esperado que este tipo de pesquisa traga benefícios às pacientes por ele tratadas, não se pode dizer que a senhora se beneficiará. Protocolos de pesquisa são baseados na análise de grandes populações estudadas, sendo impossível estimar o benefício individual de cada paciente recrutado para o estudo. Por outro lado, é possível que futuras pacientes possam ser beneficiadas com os resultados deste estudo. A senhora não receberá nenhum tipo de indenização por complicações ou seqüelas causados pelo tratamento.

CONFIDENCIALIDADE:

Todos os dados obtidos durante o estudo, relacionados a você, serão mantidos em sigilo pelo médico responsável da pesquisa. Nenhuma informação envolvendo seu nome será fornecida a qualquer pessoa, à exceção dos médicos participantes no tratamento. Você não será identificada pessoalmente em qualquer relatório baseado neste tratamento. Os dados do seu caso serão computadorizados e anonimamente utilizados em um relatório final sobre os resultados obtidos, os quais serão usados, divulgados e publicados em revistas médicas, congressos ou qualquer evento médico que se fizer necessário, de acordo com os regulamentos atualmente em vigência.

PROTEÇÃO DA PACIENTE :**• Comitê de Ética :**

Este projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do IBCC cuja finalidade é verificar se as condições exigidas para sua proteção e o respeito a seus direitos estão sendo cumpridos.

Em caso de dúvida entrar em contato com Dr. Ronaldo Lúcio Rangel Costa – Secretário do CEP através do telefone: 3474 4222 ramal 4263.

SEUS DIREITOS:

Você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não participar deste tratamento. Poderá recusar e, se aceitar, poderá abandonar o tratamento a qualquer momento sem ter que fornecer qualquer razão que justifique sua decisão. Além do mais, seu médico terá que lhe avisar se novas informações estiverem disponíveis e forem relevantes para o seu desejo em continuar a participar deste tratamento.

Sua recusa ou abandono subsequente não terá efeito no seu relacionamento com seu médico. Se você desejar, seu médico irá continuar a tratá-la com os melhores meios disponíveis. Seu relacionamento com a equipe médica não será afetado pela sua decisão. Se você tiver quaisquer dúvidas sobre este tratamento, por favor, exponha-as ao seu médico.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA PACIENTE

"Título do Projeto".

Determinação dos genes PRSS11, MTSS1 e CLPTM1 para validação da resposta ao tratamento quimioterápico com doxorubicina e associações no câncer de mama

SEÇÃO DO INVESTIGADOR: (a ser preenchido pelo investigador)

Nome do investigador :Edison Mantovani Barbosa ou Ana Paula Santana de Abreu..... Local : IBCC/ FMUSP

Pessoa de contato : Edison Mantovani Barbosa ou Ana Paula Santana de Abreu.....

Número do telefone:3474-4222

Confirmo que expliquei o estudo clínico detalhadamente à paciente. Forneci uma folha de informações e respondi a todas as perguntas que a paciente tinha em relação ao estudo.

Assinatura..... Data.....

SEÇÃO DA PACIENTE: (a ser preenchida pela paciente)

Código da paciente*

Nome da paciente.....

Endereço

Telefone.....

SEÇÃO DO REPRESENTANTE LEGAL DA PACIENTE:

(quando necessário à autorização através de outra pessoa que não a paciente. A ser preenchida por este representante).

Grau de parentesco com a paciente:.....

Nome do representante legal:

Recebi, li e entendi a **Folha de Informação do Paciente** denominada Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o tratamento acima. Também recebi uma explicação adequada sobre este estudo clínico, seus propósitos, riscos e sobre meus direitos como paciente e o que será feito por mim. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas antes de tomar qualquer decisão. Poderei solicitar ao meu médico informações adicionais a qualquer momento.

Sei que a decisão de tomar parte deste tratamento é só minha e que tenho o direito de mudar de idéia a qualquer momento durante o curso do estudo sem que isto afete meu tratamento futuro. Deverei informar, em seguida, o meu médico.

Também entendi que o acesso às informações relevantes a partir de meus registros poderá ser solicitado como parte do tratamento e que os dados reunidos durante o mesmo poderiam ser verificados pelas Autoridades de Saúde e representantes do patrocinador, de acordo com a atual legislação.

Estou certa de que não serei identificada a partir dos dados extraídos de meus registros e que todos estes serão processados com o máximo de confidencialidade.

Com base nisso, autorizo minha participação nesta pesquisa.

Assinatura do paciente ou representante legal:

Datado pelo paciente ou representante legal: ____/____/____