Yuri Nagamine Urata

**Expressão gênica diferencial do câncer de mama de
pacientes pós-menopausadas responsivas e não-
responsivas ao efeito antiproliferativo da vitamina D**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Urata, Yuri Nagamine

Expressão gênica diferencial do câncer de mama de pacientes pós-menopausadas
responsivas e não-responsivas ao efeito antiproliferativo da vitamina D / Yuri
Nagamine Urata. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Vitamina D 3.Calcitriol 4.Análise de
sequência com séries de oligonucleotídeos

USP/FM/DBD-331/10

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas,
eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de
caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”*

Chico Xavier

*A Deus,
Por sempre acreditar e
mostrar o caminho correto
para a felicidade eterna;*

*Ao esposo,
Por seu amor, compreensão,
apoio em todos os momentos;*

*Aos meus pais,
Por sua dedicação e por me
encorajar a seguir meus
sonhos;*

*Aos meus irmãos,
Pela companhia e amizade de
sempre.*

AGRADECIMENTOS

À querida orientadora Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira por tornar possível o desenvolvimento deste doutorado, por sua orientação, pelo acolhimento que recebi em horas difíceis e por acreditar no meu trabalho quando eu andava a passos vacilantes.

À professora Maria Mitzi Brentani, quem abriu as portas do departamento para mim e de pronto me aceitou, estando eu do outro lado do mundo, sem sequer me conhecer.

Ao professor Roger Chammas, por incentivar os alunos a sempre buscarem conhecimento e análise crítica na área da pesquisa.

À querida Lúcia, Maria Lúcia Hirata Katayama, por todo apoio, incentivo, dedicação, risos e amizade.

À querida Rose, Rosimeire Aparecida Roela, pela paciência e dedicação em ensinar a manusear “a menina de seus olhos”, a plataforma Affymetrix e pelo companheirismo, amizade e muita calma para me transmitir em horas cruciais, como problemas com o scanner e falta de energia.

Ao professor Igor Snitkovisky por seu profundo conhecimento e humildade ao guiar o aluno a construir uma linha de raciocínio.

Ao colega Eduardo Carneiro de Lyra por sua dedicação e esforço na coleta das amostras.

Aos médicos Ricardo Basso e Ana Paula Torres por sua dedicação e disponibilidade na leitura das lâminas de imunohistoquímica para Ki-67 e das lâminas criopreservadas para extração do RNA.

À Patrícia Rozenchan, Fátima Pasini e Flávia Rotea Mangone pelo companheirismo.

À amiga Cintia Milani, por toda sua força, dedicação, coragem e exemplo para eu me tornar uma pessoa e uma pesquisadora melhor.

Aos inestimáveis amigos Adriana Trappé, Laura Campos, Simone Crestoni Fernandes, Natália Broberg, Paulo delVale, Elen Bastos, Simone Viera da Costa, Karina Escobar, Bruno Cadima, Iara Sant’ana Rodrigues, Cibele Ferrari, Arthur Alvarenga, Carla Pinheiro e Suzana Terumi Honda.

À Maria José Gonçalves Benevides, Rosilene Arruda, Elizângela Dias Neto e Ivonete Lima, pelo carinho, auxílio e prontificação em assuntos administrativos que somente elas sabem.

Ao Jair Cláudio Alves Oliveira e Wilame Silva Macedo por toda ajuda e dedicação em manter nosso laboratório em ordem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) por financiar este projeto.

Às todas as pessoas que de alguma maneira ajudaram na conclusão deste trabalho.

A todo LIM24 por trabalharmos harmoniosamente por um mesmo propósito: gerar conhecimento científico de qualidade.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	12
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	13
III. 1. Pacientes.....	13
III. 2. Critérios de inclusão.....	17
III. 3. Critérios de exclusão.....	17
III. 4. Coleta e transporte de amostra.....	18
III. 4. 1. Tumor.....	18
III. 4. 2. Sangue.....	18
III. 4. 2. 1. Dosagem sérica de vitamina D, 25(OH)D3.....	19
III. 5. Processamento das amostras coletadas.....	19
III. 5. 1. Amostras tamponadas (para imunohistoquímica).....	19
III. 5. 2. Amostras criopreservadas (para extração de RNA).....	20
III. 6. Expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica.....	20
III. 7. Extração de RNA.....	22
III. 8. Tecnologia de cDNA <i>microarray</i> (<i>Two-cycle</i>).....	23
III. 8. 1. Síntese de cDNA por dos ciclos.....	25
III. 8. 1. 1. Primeiro ciclo.....	25

III. 8. 1. 2. Segundo ciclo.....	26
III. 8. 2. Síntese de cRNA marcado com biotina.....	28
III. 8. 2. 1. Purificação do cRNA marcado com biotina.....	28
III. 8. 3. Fragmentação do cRNA marcado com biotina para hibridização.....	29
III. 8. 4. Hibridização.....	29
III. 9. Síntese de cDNA.....	30
III. 10. Real time PCR (qRT-PCR).....	30
III. 10.1. Análise dos resultados de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.....	32
III. 11. Estatística.....	33
IV. RESULTADOS.....	34
IV. 1. Determinação a expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica.....	34
IV. 2. Análise da expressão gênica por cDNA <i>microarray</i>	41
IV. 2. 1. Amplificação das amostras de RNA total.....	41
IV. 2. 2. Hibridização dos <i>chips</i> de DNA <i>microarray</i>	44
IV. 2. 2. 1. Parâmetros de qualidade dos dados gerados pelo <i>array</i>	45
IV. 2. 3. Normalização das intensidades dos chips de cDNA <i>microarray</i>	50
IV. 2. 4. Filtragem dos genes de acordo com a expressão.....	55
IV. 2. 5. Efeito da suplementação de calcitriol no perfil transcricional de pacientes pós-menopausadas com câncer de mama.....	55
IV. 2. 5. 1. Efeito da suplementação de calcitriol no perfil transcricional de pacientes pós-menopausadas com câncer	57

de mama - Grupo I.....	
IV. 2. 5. 2. Efeito da suplementação de calcitriol no perfil transcricional de pacientes pós-menopausadas com câncer de mama - Grupo II: Somente amostras pré-suplementação com calcitriol.....	66
IV. 2. 6. Efeito da suplementação com calcitriol em genes selecionados diferencialmente expressos verificados por PCR em real time.....	68
V. DISCUSSÃO.....	74
VI. CONCLUSÃO.....	85
VII. ANEXOS.....	86
VIII. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

CYP27B1	25-Hidroxicolecalciferol 1-Hidroxilase
RNA	Ácido ribonucleico
aRNA	Ácido Ribonucleico amplificado
cRNA	Ácido ribonucleico complementar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
GCOS	Affymetrix GeneXhip Operating
CAT	Amostras pós-suplementação
CA	Amostras pré-suplementação
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CLI	Carcinoma lobular invasivo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotritol
cDNA	DNA complementar
VDRE	Elemento responsivo de vitamina D
PM	Emparelhamento completo (<i>perfect match</i>)
MM	Emparelhamento incompleto (<i>mismatch</i>)
CYP24A1	enzima 24-hidroxilase
RT	Enzima Transcriptase Reversa
NF-κB	factor nuclear kappa B
FDR	<i>False discovery rate</i>
TGFα	fator de crescimento transformante alfa
BRCA1	<u>genes supressores de tumor, cujas variações do BRCA1 levam ao risco aumentado de câncer de mama</u>
BRCA2	<u>genes supressores de tumor, cujas variações do BRCA2 levam ao risco aumentado de câncer de mama</u>
HE	Hematoxilina-eosina
MCF-7	Linhagem celular epitelial mamária humana bem diferenciada derivada de
Ki-67	infusão pleural de adenocarcinoma]
μg	Marcador de proliferação celular
μL	Micrograma
mL	Microlitro
mM	Mililitros
MeV	Milimolar
nM	<i>MultiExperimet Viewer</i>
PCA	Nanomolar
p21	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<u>Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular</u>
RXR	Reação em cadeia da Polimerase
ER	Receptor de ácido retinóico
PR	Receptor de estrógen
VDR	Receptor de progesterona
EGFR	Receptor de vitamina D
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
RAR	Receptor epidermal humano tipo 2
RIN	Receptor retinóide A
RMA	<i>RNA integrity number</i>
SAM	<i>Robust Multichip Averaging</i>
UI	<i>Significant Analysis of Microarrays</i>
	Unidades internacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama simplificado do metabolismo da vitamina D e alguns efeitos fisiológicos do metabólito ativo da vitamina D, calcitriol (Adaptado do site www.uptodate.com “Metabolism of vitamin D”, por Agus ZS).	3
Figura 2	Esquema ilustrativo do primeiro e segundo ciclo de amplificação, hibridização e aquisição de imagens.	24
Figura 3	Expressão de Ki-67 em amostras do grupo controle.	35
Figura 4	Expressão de Ki-67 por imunohistoquímica em amostras de câncer de mama no grupo controle da biópsia e do produto da cirurgia de pacientes que não realizaram suplementação com calcitriol.	37
Figura 5	Expressão tumoral percentual de Ki-67 antes e após suplementação de calcitriol.	38
Figura 6	Expressão de Ki-67 em amostras pareadas de câncer de mama antes e após suplementação de calcitriol.	39
Figura 7	Integridade do RNA extraído das amostras.	43
Figura 8	Representação esquemática do <i>probe set</i> constituído por 11 pares de <i>probes</i> representando diferentes regiões do transcrito após processamento da imagem.	45
Figura 9	Controle de hibridização do <i>array</i> de acordo com a imagem gerada pelo controle Oligo B2: bordas com intensidades alternadas e o quadrado padrão em cada canto (A) e a formação do nome do <i>array</i> (B).	46
Figura 10	Expressão global relativa por amostra de todos os genes representados no chip. Antes da normalização com o algoritmo RMA: (A) todas as amostras pareadas pré e pós-suplementação e (B) amostras de pacientes pré-suplementação com calcitriol consideradas responsivas ou não-responsivas. Após a normalização: (C) as amostras pareadas pré e pós-suplementação e (D) amostras de pacientes pré-suplementação com calcitriol consideradas responsivas ou não-responsivas. Eixo Y: intensidade do sinal, eixo X: amostra	52

Figura 11	Agrupamento de amostras de acordo com a análise Principal Component: (A) As amostras de pacientes antes e após a suplementação foram agrupadas, na maioria dos casos, próximas (somente os pares das amostras 15 e 21 ficaram mais afastadas), (B) Utilizando somente amostras pré-suplementadas, observou-se uma distinção espacial entre o grupo de pacientes consideradas responsivas e não-responsivas.	54
Figura 12	Expressão dos genes <i>VDR</i> (receptor de vitamina D) e <i>CYP24A1</i> (24-hidroxilase) antes e após a suplementação com calcitriol. Os valores mostrados correspondem à intensidade de sinal de cada transcrito no microarray normalizado por RMA. Não houve diferença de expressão após a suplementação com calcitriol desses transcritos. Marcações em vermelho correspondem às amostras pré-suplementação e azul, às amostras pós-suplementação.	57
Figura 13	Clusterização hierárquica de amostras pré e pós-suplementação de calcitriol. Foram identificados 48 probes diferencialmente expressos pela análise SAM. As amostras obtidas da mesma paciente agruparam-se lado-a-lado.	58
Figura 14	Clusterização hierárquica das amostras pré e pós-suplementação de calcitriol segundo a expressão gênica diferencial determinada após análise pelo teste RankProd. (A) Genes cuja expressão mostrou-se aumentada e (B) diminuída após a suplementação com calcitriol.	60
Figura 15	Transcritos selecionados para validação envolvidos na resposta inflamatória e associados a câncer de mama de acordo com a ferramenta computacional <i>ToppGene</i> .	64
Figura 16	Heatmap com dendograma dos <i>probes</i> selecionados para a validação por PCR em tempo real. Esses <i>probes</i> agruparam as amostras da seguinte maneira: pareadas (destacadas em verde), amostras pré-suplementação (destacadas em vermelho), e amostras pós-suplementação (destacadas em azul).	65
Figura 17	Expressão do gene <i>THBS1</i> no <i>microarray</i> . Amostras não-responsivas tendem a apresentar maior expressão deste transcrito.	66

Figura 18	<i>Heatmap</i> com dendograma dos 77 <i>probes</i> diferencialmente expressos nas amostras de pacientes consideradas responsivas e não-responsivas. Os <i>probes</i> separaram as amostras responsivas das não-responsivas.	67
Figura 19	Correlação entre a expressão gênica gerada pelo <i>microarray</i> e PCR em tempo real. O nível de expressão dos transcritos <i>ATF3</i> , <i>CXCL2</i> , <i>EGR1</i> , <i>FOS</i> , <i>PTGS2</i> e <i>RGS1</i> foram verificados por PCR em tempo real mostrado no eixo X e houve correlação com o nível de intensidade no <i>microarray</i> apresentado no eixo Y. Todos os valores mostrados estão em log2.	69
Figura 20	Expressão relativa dos transcritos selecionados por PCR em tempo real. <i>Boxplot</i> representa a distribuição de todos os valores entre as barras (<i>quartile</i> 25, 50 e 75 na caixa) exceto <i>outliers</i> . O <i>boxplot</i> da esquerda representa as amostras pré-suplementação (n = 20) e o <i>boxplot</i> da direita representa as amostras após suplementação (n = 20). Os gráficos contendo <i>boxplots</i> azuis, não apresentaram diferença estatística significativa na comparação da expressssão pré e pós-suplementação e os vermelhos apresentaram um valor de $p < 0,05$.	71
Figura 21	Expressão do transcrito <i>FOSB</i> após a normalização da intensidade de sinal do <i>microarray</i> . Apesar deste gene ser hiper-regulado após a suplementação com vitamina D e apresentar um <i>fold</i> (expressão pós/expressão pré) alto (2,95) no <i>microarray</i> , não pode ser validado por PCR em tempo real. Marcações em vermelho correspondem às amostras pré-suplementação e azul, às amostras pós-suplementação	72
Figura 22	Expressão do gene <i>THBS1</i> , selecionado para validação por PCR em tempo real. Todas as amostras foram normalizadas com a expressão do transcrito <i>GAPDH</i> .	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das pacientes suplementadas com vitamina D (análise de <i>microarray</i> foi feita nas amostras destacadas em negrito). ER: expressão do receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona, CDI: carcinoma ductal invasivo, CLI: carcinoma lobular i	15
Tabela 2	Características das pacientes do grupo controle (sem suplementação com calcitriol), mostrando a análise histopatológica, expressão do receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR), receptor epidermal humano tipo 2 (HER2) e acometimento linfonodal. Siglas para a análise histo-patológica, carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI).	16
Tabela 3	<i>Primers</i> utilizados para amplificação dos transcritos selecionados para validação por PCR em tempo real.	31
Tabela 4	Expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica em amostras provenientes da biópsia e da cirurgia de pacientes que não receberam a suplementação de calcitriol. As lâminas foram lidas por 3 observadores (obs. 1, obs. 2 e obs.3) e a porcentagem de células positivas para a proteína Ki-67 foi obtida após a contagem de 1000 células. Considerando o limiar de resposta estabelecido em 40,78%, somente as pacientes C1, C11 e C19 seriam classificadas como responsivas.	36
Tabela 5	Expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica antes e após a suplementação de calcitriol. As reações foram lidas por 3 observadores (obs. 1, obs. 2 e obs.3) e a porcentagem de células positivas para a proteína Ki-67 foi obtida após a contagem de 1000 células. A variação entre a média pré e pós- suplementação foi calculada e as pacientes foram categorizadas em responsivas (redução maior que 40,78%, percentil 60) e não-responsivas (redução menor que 40,78%, destacadas em vermelho na tabela). “nd”, não determinado.	40

Tabela 6	Características do RNA extraído das amostras. A quantificação do ácido nucleico foi feita no Nanodrop e a qualidade do RNA foi verificada no <i>Bioanalyser</i> . Amostras destacadas em vermelho não foram utilizadas para análise de <i>microarray</i> por apresentar o “número de integridade de RNA” muito abaixo do limiar de 6,0. “CA”, pré-suplementação; “CAT”, pós-suplementação.	42
Tabela 7	Qualidade dos dados gerados pelos <i>arrays</i> . Verificação da intensidade de fundo, do ruído e da porcentagem de <i>probes</i> presentes nos <i>arrays</i> hibridizados. Na coluna “amostra”, o número representa a identificação da amostra, “CA” é a designação para amostra proveniente da biópsia (pré-suplementação) e “CAT”, a designação para amostra proveniente da cirurgia (pós-suplementação).	48
Tabela 8	Parâmetros para os valores gerados pelo cDNA <i>microarray</i> para os controles de hibridização (razão $3'/5' < 3,0$).	49
Tabela 9	Agrupamento das amostras segundo a suplementação de calcitriol. Grupo I, comparação entre as amostras antes e após a suplementação com calcitriol. Grupo II, comparação entre as amostras consideradas responsivas (redução da porcentagem de células positivas com o marcador de proliferação celular Ki-67 maior que 40,78%) e não-responsivas (redução menor do que 40,78%). Amostras destacadas em vermelho foram classificadas como não-responsivas.	56
Tabela 10	<i>Probes</i> diferencialmente expressos em comum nos testes SAM e RankProd. Foram selecionados os transcritos destacados em vermelho para a validação da expressão diferencial por PCR em tempo real.	61
Tabela 11	Vias enriquecidas nos quais os <i>probes</i> selecionados estão inseridos a partir de análise com a ferramenta <i>ToppGene</i> ($p < 0,05$).	63

RESUMO

Baixos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol) podem estar associados à incidência e prognóstico do câncer de mama. Além disso, vários estudos indicam que a vitamina D tenha um efeito antiproliferativo em linhagens celulares de câncer de mama expostas a concentrações supra-fisiológicas de calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 100nM). A suplementação com vitamina D é indicada a mulheres pós-menopausadas para prevenção de osteoporose e observamos previamente que a suplementação de calcitriol a pacientes pós-menopausadas com câncer de mama causa redução do índice proliferativo tumoral. Entretanto, não há estudos até o momento que avaliam o efeito da vitamina D na expressão gênica global in vivo. Incluímos 31 pacientes pós-menopausadas com câncer de mama. Estas pacientes realizaram suplementação com calcitriol (0,5µg/dia, dose indicada para prevenção de osteoporose) por um curto período de tempo (mediana de 32 dias). A amostra tumoral foi coletada por ocasião da biópsia (pré-suplementação) e da ressecção tumoral (pós-suplementação). Os perfis de expressão gênica de 16 pacientes foram analisados a partir de 100ng de RNA total no gene chip U133 Plus 2.0 Affymetrix. Observamos redução na expressão de Ki-67 após a suplementação. Dentre os genes diferencialmente expressos encontram-se *EGR1*, *FOS*, *DUSP1*, *MMP12* e *RGS1*, os quais foram mais expressos em amostras pós-suplementadas. Genes modulados pela vitamina D estão associados à resposta inflamatória e à membrana. Nossos resultados indicam que a suplementação com vitamina D reduz o índice de proliferação tumoral, sendo a mesma envolvida em vias importantes na regulação da resposta inflamatória.

Descritores: Neoplasias da mama, Vitamina D, Calcitriol, Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos.

SUMMARY

Low 25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂D₃ serum levels may be associated with breast cancer incidence and prognosis. Additionally, the antiproliferative effects of vitamin D are observed in breast cancer cell lines exposed to pharmacological doses of calcitriol (1,25(OH)₂D₃, 100nM). Vitamin D supplementation is indicated for post-menopausal women to prevent osteoporosis and a previous study from our group observed a reduced tumor proliferative index after calcitriol supplementation on post menopausal breast cancer patients. However, there is no study that verifies the effect of vitamin D on gene expression profile *in vivo* so far. Thirty one post menopausal breast cancer patients were included on our analysis. They were supplemented with calcitriol after tumor biopsy (0.50µg/day, indicated dose for osteoporosis prevention) for a short period of time (median 32 days). Tumor samples were collected during biopsy (before supplementation) and breast surgery (after supplementation). Gene expression profile of 16 patients was analyzed using the U133 Plus 2.0 Affymetrix Gene Chips from 100ng of total RNA. After supplementation, a reduced expression of Ki-67 was observed. Among the differentially expressed genes, *EGR1*, *FOS*, *DUSP1*, *MMP12* and *RGS1* were upregulated after calcitriol supplementation. Differentially expressed genes were involved in inflammatory response or were associated with the membrane. Our results indicate that calcitriol supplementation diminish tumor proliferation index regulating inflammatory pathways.

Descriptors: Breast neoplasms, Vitamin D, Calcitriol, Oligonucleotide Array Sequence Analysis.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama possui alta morbidade e mortalidade, sendo o segundo tipo de câncer que mais acomete as mulheres no Brasil, após o carcinoma de pele não-melanoma, com a estimativa de 49.240 novos casos diagnosticados em 2010 (Inca, Ministério da Saúde, 2010).

O tratamento do câncer de mama depende de características clínicas e patológicas do tumor, assim como do estado de saúde do paciente. A detecção precoce da neoplasia e os diagnósticos histológicos precisos são necessários para um tratamento adequado e eficiente (Eniu *et al.*, 2006).

Alguns fatores de risco estão comumente envolvidos no desenvolvimento do carcinoma mamário. Uma revisão de Salehi *et al.* (2008), indica como fatores principais: história familiar, fatores hormonais e reprodutivos, estilo de vida e fatores ambientais. A história familiar por ser encontrada em 5-10% dos casos de câncer de mama e mutações em genes como *BRCA1* e *BRCA2* apresentam alta penetrância. Os fatores hormonais refletem o tempo de exposição da mama aos estrógenos, assim a menarca precoce e menopausa tardia, o uso de contraceptivos, a nuliparidade, a terapia de reposição hormonal, freqüentemente estão associados ao risco de desenvolver um carcinoma mamário. A obesidade, pouca atividade física, etilismo e tabagismo, assim como fatores ambientais, como a exposição a carcinógenos, também foram correlacionados com o risco aumentado de câncer de mama. Adicionalmente, estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição solar está inversamente correlacionada ao risco de desenvolver certos tipos de câncer, como mama, próstata e cólon (Garland *et al.*, 1980;

Garland *et al.*, 1990; Giovannucci, 2005 e John *et al.*, 2005).

A vitamina D provém da dieta e da produção endógena induzida pelos raios ultravioletas B do sol. A exposição solar induz na pele a síntese não-enzimática (fotólise química) de 7-deidrocolesterol em vitamina D₃ (colecalfiferol ou pré-vitamina D₃). A vitamina D pode ser obtida pela dieta através do colecalfiferol, de origem animal e o ergocalciferol (vitamina D₂), de origem vegetal (Welsh *et al.*, 2003), entretanto a mais importante fonte de vitamina D advém de sua síntese na pele, uma vez que pequenas exposições à luz solar equivalem à ingestão de 200UI/dia (Haddad, 1992). A vitamina D é encontrada em alimentos como peixes e em alimentos enriquecidos com vitamina D₂ (ergocalciferol) sintética.

A vitamina D proveniente da dieta é absorvida no intestino delgado na forma lipossolúvel incorporada a quilomícron. No fígado, esse complexo se liga a uma proteína-ligante de vitamina D e é metabolizado, juntamente com a vitamina D₃ sintetizada pela derme. A vitamina D sofre hidroxilação na posição C-25 pela enzima hepática 25-hidroxilase, resultando na formação da 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃ ou calcidiol), principal forma circulante da vitamina D (Brown, 1999). O fígado, em geral, armazena vitamina D, mas quando há grande ingestão da mesma, o excesso é armazenado no tecido adiposo (De Luca, 2004). Nos rins ocorre uma segunda hidroxilação na posição C-1 do calcidiol através da enzima 1-alfa-hidroxilase, formando o 1,25(OH)₂D₃, a forma mais ativa da vitamina D (Zehnder *et al.*, 1999). Além disso, as células tubulares renais também contêm a enzima 24-hidroxilase, capaz de hidroxilar tanto o calcidiol (25(OH)D₃) quanto o calcitriol (1,25(OH)₂D₃) na posição C-24, resultando no metabólito menos ativo 24,25-dihidroxitamina D (24,25(OH)₂D₃)

(Figura 1). Assim, os níveis séricos de vitamina D circulante dependem da ingestão de vitamina D (através da dieta e/ou suplementação), da produção endógena (através de sua síntese pela pele) e da atividade das enzimas que a metabolizam.

Figura 1. Diagrama simplificado do metabolismo da vitamina D e alguns efeitos fisiológicos do metabólito ativo da vitamina D, calcitriol (Adaptado do site www.uptodate.com “Metabolism of vitamin D”, por Agus ZS).

A vitamina D é importante na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo, além de regular a expressão de diversos genes associados à proliferação, na qual a vitamina D ativa a cascata de sinalização pela via genômica ou não-genômica.

Na via clássica ou genômica, o metabólito ativo calcitriol penetra a membrana celular e se liga ao receptor nuclear de vitamina D (VDR). Este complexo forma heterodímero com o receptor de ácido retinóico (RXR) e às vezes, com o receptor retinóide A (RAR), que se liga a elementos responsivos de vitamina D (VDRE) (Lips, 2006). Este heterodímero interage com complexos co-ativadores, os quais associam o VDR ao complexo da RNA polimerase de genes alvos, levando a transcrição e tradução dos mesmos. Vários genes possuem VDREs funcionais, incluindo genes relacionados à manutenção dos ossos (como a osteocalcina, osteopontina, sialoproteína), ao hormônio do crescimento e da paratireóide, ao ligante ativador do receptor de NF- κ B (RANKL), ao fator de necrose tumoral, fibronectina, entre outros (Beer e Myrthue, 2004). Liu *et al.* (1996) demonstraram também que o gene *CIP-1/WAF-1* é induzido transcricionalmente pelo calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) por via dependente de VDR e independente de *TP53*, pois foram identificadas na região promotora de p21, elementos de resposta à vitamina D, VDRE.

O calcitriol pode também influenciar a transcrição gênica de modo indireto. Em tumores cujo crescimento é dependente da expressão aumentada de $\text{TGF}\alpha/\text{EGFR}$, o calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) induz o recrutamento do EGFR ativado (ligado ao ligante) nos endossomas, reduzindo o sinal indutor de proliferação, advindo do receptor ativado (EGFR) na membrana celular e da

transativação do gene da ciclina D1 no núcleo (Cordeiro *et al.*, 2002). Portanto, a vitamina D está envolvida principalmente na indução de genes importantes no controle do ciclo celular, como p21^{WAF1, CIP1}, p27, TGF- α .

O outro mecanismo de ativação não-genômico, mediado pelo calcitriol, é rápido e não depende de transcrição, não se sabe que sinal que desencadeia a cascata, mas estudos descrevem o envolvimento de um receptor de membrana não-clássico (memVDR) e uma proteína-ligante de resposta rápida associada a 1,25(OH)₂D₃ de membrana (1 α ,25D₃-MARRS) (Huhtakangas *et al.*, 2004; Nemere *et al.*, 2004). Um exemplo da resposta não-genômica é a rápida absorção intestinal de Ca²⁺, que envolve inúmeras vias de ativação, como a da proteína kinase C (PKC), que resulta na abertura rápida de canais de Ca²⁺, aumentando o Ca²⁺ intracelular (Wali *et al.*, 1990). Entretanto há um *cross-talk* entre as vias genômica e não-genômica de ativação do VDR pelo calcitriol.

Assim, a expressão do receptor de vitamina D está diretamente relacionada na modulação da proliferação e diferenciação celular e indução de apoptose em células tumorais (Boullion *et al.*, 2006; Colston e Hansen, 2002; Christakos *et al.*, 2003). O receptor de vitamina D (VDR) se encontrou expresso em mais de 30 tipos de tecidos, incluindo intestino, cólon, mama, pulmão, ovário, osso, rim, glândula paratireóide, células- β pancreáticas, monócitos, queratinócitos e células tumorais (Jones *et al.*, 1998). Estudos descrevem que em câncer de pulmão, a diminuição de expressão de VDR foi associada a um maior grau histológico do tumor (Menezes *et al.*, 2008) e, em linhagens celulares de câncer de cólon a menor expressão de VDR foi correlacionada a linhagens celulares menos diferenciadas, como a SW620. A expressão diminuída de VDR também foi observada em 9/12 casos de neoplasias

malignas de cólon, comparadas ao tecido adjacente normal (Shabahang *et al.*, 1993).

Em contrapartida, em câncer de mama, foram relatados estudos, nos quais não houve diferença significativa na expressão do VDR entre os tecidos normais e tumorais (Bortman *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2006; Lyra, tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2006). Adicionalmente, Ellison *et al.* (2008) observaram que camundongos VDR (-/-) eram mais suscetíveis a desenvolver tumores de pele após indução química do que camundongos knockout para 25-hidroxivitamina D₃ 1-alfa-hidroxilase, CYP27B1 (-/-), indicando que o VDR, e não a vitamina D em si, é essencial à proteção contra tumorigênese neste sistema, uma vez que o VDR participa no reparo e na remoção de queratinócitos que apresentavam danos e adaptação da pele a exposição crônica aos raios ultra-violetas.

Outro fator que pode influenciar a via de sinalização da vitamina D é a presença de enzimas que metabolizam o hormônio em outros tecidos e órgãos, que não o rim. Demonstrou-se em rim a presença tanto de 1 α -hidroxilase, codificada pelo gene *CYP27B1* e responsável pela ativação do hormônio, quanto de 24-hidroxilase, codificada pelo gene *CYP24A1*, que promove uma oxidação no carbono 24, dando origem aos metabólitos 24,25(OH)₂D₃ ou 1,24,25 (OH)₃D₃, que embora capazes de induzir absorção de cálcio intestinal, possuem menor capacidade na mobilização do cálcio a partir os ossos (Holick *et al.*, 1973 e Wang *et al.*, 1993). A expressão de 24-hidroxilase é induzida pelo próprio hormônio em células leucêmicas promielocíticas humanas HL60 (Inaba *et al.*, 1991), células de câncer de próstata (Skowronski *et al.*, 1995), fibroblastos da pele (Eil *et al.*, 1986) e também em células de mama MCF-7

(Swami *et al.*, 2000). Contudo, têm sido relatados estudos, nos quais a indução de *CYP24A1* (24-hidroxilase) pode resultar na metabolização e inativação de calcitriol, resultando na resistência de linhagens celulares tumorais (de mama, colo e próstata) aos efeitos antiproliferativos da vitamina D. Sugere-se que esse efeito antiproliferativo causado pelo calcitriol seja inversamente proporcional à atividade do *CYP24A1* nas células, uma vez que na linhagem celular de próstata, DU145, o nível de indução de *CYP24A1* é alto e essas células são menos responsivas à inibição de crescimento com o calcitriol e o oposto ocorre, na linhagem LNCaP, que responde bem ao efeito antiproliferativo da vitamina D (Anderson *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2003). O uso de inibidores de P450, que atuam na atividade de *CYP24A1*, como o liarozol e o quetoconazol, potencializam o efeito antiproliferativo do calcitriol em tumores primários de próstata (Peehl *et al.*, 2002), indicando o efeito aditivo que algumas drogas podem ter ao serem associadas à vitamina D.

Além disso, a expressão de *CYP24A1* encontrou-se aumentada nos tumores de colo, pulmão e ovário, comparados ao tecido normal. Embora a expressão tecidual de VDR, 1-alfa-hidroxilase e 24-hidroxilase ter sido similar no tumor de pacientes com câncer em relação a tecido mamário de mulheres sem câncer (Lyra *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2006), um estudo demonstrou que a amplificação de 24-hidroxilase em carcinoma de mama, apontando para a importância desta via na carcinogênese mamária (Albertson *et al.*, 2000).

Tentando compreender as vias moduladas pelo calcitriol, alguns autores avaliaram perfil gênico de linhagens de câncer de mama expostas a vitamina D. Swami *et al.* (2003), verificaram que o tratamento com o calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ativava vias de sinalização distintas em linhagens celulares

MCF-7 (receptor de estrógeno, ER, positiva) e MDA-MB-231 (ER negativas). Além disso, Townsend *et al.* (2006), também verificaram o perfil de expressão diferencial entre a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 resistente e MCF-7 sensível, ao tratamento de 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por *microarray*. No grupo de células sensíveis ao calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), houve a expressão diferencial de genes envolvidos na proliferação e apoptose, como *BAX*, *GADD45*, *IGFBP-3*, *EGFR*, *MAPK4* e *TGF β* . Os autores sugerem que através desta metodologia, seja possível diferenciar populações de células tumorais responsivas ao tratamento com calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

É importante ressaltar que como a concentração sérica de vitamina D declina com a idade na maioria das mulheres idosas. Além disso, a densidade mineral óssea decresce após a menopausa e a osteoporose afeta milhões de indivíduos idosos, sendo responsável por inúmeras fraturas por ano. Logo, a vitamina D é habitualmente prescrita a mulheres na pós-menopausa, com o objetivo de reduzir a perda óssea, pois estudos sugerem que a suplementação de vitamina D a mulheres com mais de 70 anos e insuficiência de vitamina D, resulta em aumento dos níveis séricos do hormônio e benefício na densidade mineral óssea (Dawson-Hughes *et al.*, 1997, Ooms *et al.*, 1995, Chapuy *et al.*, 1992 e Trivedi *et al.*, 2003). Além disso, a suplementação com calcitriol 0,25 μg , duas vezes ao dia trouxe benefício na redução do número de fraturas em pacientes que receberam essa suplementação (Tilyard *et al.*, 1992).

A suplementação da vitamina D pode ser tanto na forma de colecalciferol (vitamina D_3) quanto de calcitriol, metabólito ativo da vitamina D, mas para ambas as suplementações, a dosagem ideal de vitamina D não está bem determinada. Por exemplo, a quantidade de colecalciferol pode variar de

acordo com a maneira que a vitamina D é suplementada: autores sugerem uma única dose de 100.000 unidades internacionais (UI), a cada 2 ou 4 meses (Ilahi *et al.*, 2008 e Trivedi *et al.*, 2003) ou doses diárias de 200, 400 e 600 UI para pacientes nas faixas etárias menores de 50, entre 50 e 70 e maiores de 70 anos de idade, respectivamente (Giovannucci, 2005). Ilahi *et al.* (2008), em estudo com 40 pacientes saudáveis, relataram que a suplementação de 100.000 UI de colecalciferol em dose única, aumenta a concentração de calcidiol circulante, atingindo o pico de concentração sérica no sétimo dia ($42,0 \pm 9,1$ ng/mL) e retornando aos níveis mínimos de suficiência (32,1 ng/mL) após o 84º dia. Entretanto, esta suplementação é suficiente somente para indivíduos que apresentam níveis séricos basais (por volta de 30ng/mL), pois indivíduos que possuem baixo nível basal, a suplementação de 1000.000 UI não é suficiente para atingir o nível de suficiência do hormônio. Os autores concluem que a suplementação de 100.000 UI é eficiente para manter os níveis séricos de calcidiol acima de 30ng/mL, considerado a suficiência do hormônio em idosos e, indivíduos que possuem níveis basais moderados de calcidiol se beneficiariam da suplementação a cada 2 meses.

A relação entre os níveis séricos de vitamina D e o risco de desenvolver alguns tipos de câncer foi revisada recente por Holick (2008), no qual o autor sugere uma redução de 30 a 50% do risco em desenvolver câncer de coloretal, mama e próstata, caso haja um aumento de vitamina D, através da ingestão diária de 1.000 UI ao dia ou da exposição solar, elevando os níveis séricos de 25(OH)D₃ para mais de 30ng/mL. Um estudo recente verificou que a ingestão de vitamina D advinda da suplementação (alimentos enriquecidos com vitamina

D como o leite, 400UI/dia) foi independentemente associada à redução do risco de desenvolver câncer de mama (Anderson *et al.*, 2010).

Além disso, o uso de análogos de vitamina D, que mantém as propriedades terapêuticas da forma ativa metabólica da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), reduzem o efeito deletério da hipercalcemia. Os análogos já estão sendo usados em tratamentos de psoríase e hiperparatireoidismo secundário em doenças crônicas renais (Brown *et al.*, 2008).

Avaliamos a funcionalidade da via da vitamina D em pacientes com carcinoma de mama e observamos que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mas não a $25(\text{OH})\text{D}_3$ sérica, foi menor em pacientes com câncer de mama quando comparadas a mulheres sem câncer de mama (Lyra *et al.*, 2006). Outros autores também encontraram menor concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Lowe *et al.*, 2005, Bertone-Johnson *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2008) e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Janowsky *et al.*, 1999) em pacientes com câncer de mama em relação a mulheres sem a doença e Anderson *et al.* (2010) associaram a ingestão de suplementos de vitamina D (400UI/dia) a um menor risco de desenvolver câncer de mama. Variações na época da coleta das amostras podem ser responsáveis por algumas diferenças entre os estudos, pois algumas foram coletadas na época do diagnóstico, enquanto outras o foram até 27 anos antes do aparecimento da doença. Além disso, outros autores sugerem que níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parecem menores em pacientes com carcinoma de mama avançado ou metastático em relação àquelas pacientes com doença em estágio inicial (Mawer *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 2006).

Além disso, há evidências que baixos níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ao diagnóstico estejam relacionados a pior prognóstico, isto é maior chance de

recidiva da doença (Goodwin *et al.*, 2008). Por outro lado, estudo prospectivo de suplementação de cálcio e vitamina D a mulheres pós-menopausadas não demonstrou redução na incidência de câncer de mama, mas a maior ingestão de vitamina D associou-se a menor risco de câncer de mama no grupo placebo e os tumores observados no grupo de suplementação foram menores que os do grupo controle (Chlebowski *et al.*, 2006).

Em suma, observamos em estudo prévio que pacientes com câncer de mama apresentam menor nível sérico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que mulheres sem câncer (Lyra *et al.*, 2006) e que a suplementação de calcitriol por curto período de tempo a mulheres com câncer de mama causa redução do índice de proliferação tumoral (Lyra, tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2006). Contudo até o momento desconhece-se se a suplementação oral de vitamina D modula a expressão gênica. Logo, pretendemos avaliar a influência da suplementação oral de calcitriol na proliferação das células malignas e o perfil gênico de amostras de câncer de mama de pacientes pós-menopausadas.

II. OBJETIVO

Investigar a influência da vitamina D no perfil de expressão gênico do carcinoma mamário de pacientes pós-menopausadas.

II.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão de Ki-67 em amostras pré e pós-suplementação;
2. Avaliar o perfil transcricional diferencial das amostras de pacientes pré e pós-suplementação;
3. Validar a expressão gênica diferencial de alguns genes candidatos por PCR em tempo real;
4. Identificar o perfil transcricional diferencial entre amostras consideradas responsivas e não-responsivas.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. 1. Pacientes

Neste estudo foram incluídas, de modo prospectivo, pacientes pós-menopausadas atendidas no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), com hipótese diagnóstica comprovada por exame histopatológico de carcinoma invasivo da mama, estadio clínico I-III, não submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Todas as pacientes foram instruídas sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As pacientes foram atendidas pelo Dr. Eduardo Lyra e algumas delas foram incluídas em estudo prévio (Lyra, tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2006).

As pacientes também responderam a um questionário no qual constaram os seguintes itens: dados pessoais como cor, sexo, idade, idade da menarca, idade da menopausa, antecedentes obstétricos, antecedentes de uso de vitamina D, antecedentes de nefropatia, hipertensão arterial, diabetes, cardiopatia, antecedentes de câncer (como colo uterino, pele e outros antecedentes familiares de câncer).

Por ocasião do diagnóstico, foi realizado o exame clínico com mensuração do tumor e palpação de linfonodos regionais. As lesões foram mensuradas com régua e o estadiamento clínico foi realizado de acordo com os critérios da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), 6ª edição.

A pesquisa de metástase à distância foi realizada por raios-X de tórax, cintilografia óssea e ultrassonografia de abdome.

Foram incluídas 31 pacientes com câncer de mama pós-menopausadas (Tabela 1), sem metástase à distância e não-tratadas previamente para o

câncer de mama. Foram excluídas pacientes com história de cálculo renal ou hipercalcemia e em uso de corticoesteróides. Os critérios de inclusão ou exclusão estão descritos abaixo. O recrutamento das pacientes foi realizado pelo Dr. Eduardo Carneiro Lyra, mastologista do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC). Este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do IBCC e à Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o protocolo de nº0018/09, sendo aprovado em ambas instituições.

A idade mediana das pacientes foi de 62 anos e a maioria teve o diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo (CDI, 23/31 pacientes) e expressão positiva de receptor de estrógeno (ER, 18/31 pacientes) no tumor.

Estas pacientes realizaram suplementação de calcitriol por um período mediano de 32 dias, enquanto os exames de estadiamento eram feitos, até a data da cirurgia (**tabela 1**).

Foram também incluídas 18 pacientes com carcinoma de mama e que não realizaram suplementação de calcitriol pré-operatória. Estas pacientes constituíram um grupo controle. A idade mediana destas pacientes foi de 58,5 anos e similar à idade das pacientes do grupo de suplementação ($p = 0,31$, Teste de Mann-Whitney). A maioria das pacientes apresentava carcinoma ductal invasivo, CDI (12/13 pacientes) e expressão tumoral de ER (9/13 pacientes) (**tabela 2**).

Grupo calcitriol

Amostra	Idade	Dias de suplementação com vitamina D	Tipo histológico	ER	PR	HER2	Linfonodo comprometido
10	60	34	CDI	+	+	-	26
13	57	27	CDI	-	+	-	4
14	54	33	CDI	+	+	+	0
15	54	27	CM	-	-	+	0
16	62	27	CDI	+	+	+	0
17	63	32	CLI	+	-	-	0
18	50	40	CDI	-	-	-	17
19	55	28	CDI	+	+	-	0
20	52	34	CDI	+	+	+	3
21	49	28	CDI	-	-	+	5
22	58	27	CDI	-	-	-	0
23	66	53	CDI	+	+	+	20
24	65	29	CLI	-	+	-	34
25	63	28	CDI	-	+	+	12
26	49	34	CLI	-	-	-	16
27	66	34	CDI	+	+	+	2
28	56	27	CDI	+	+	+	2
29	56	48	CDI	+	+	-	0
30	62	38	CDI	+	+	-	21
31	62	30	CLI	+	-	+	3
32	56	nd	CDI	-	-	+	4
33	52	27	CDI	+	-	-	0
34	63	35	CDI	+	+	+	0
35	66	26	CDI	-	-	-	3
36	61	39	CDI	+	+	+	3
38	63	nd	nd	nd	nd	nd	nd
39	66	34	CLI	+	+	-	0
40	63	32	CLI	+	+	+	36
41	66	27	CDI	+	+	-	0
42	62	41	CDI	-	-	+	3
43	66	34	CDI	-	-	+	23

Tabela 1. Características das pacientes suplementadas com vitamina D (análise de *microarray* foi feita nas amostras destacadas em negrito). ER: expressão do receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona, CDI: carcinoma ductal invasivo, CLI: carcinoma lobular invasivo, CM: carcinoma metaplásico, nd: não determinado.

Grupo controle

Amostra	Idade	Tipo histol	ER	PR	HER2	Linfonodos
1	54	CDI	-	-	+	0
2	65	CDI	+	+	-	0
3	61	CLI	-	-	-	0
4	64	CDI	+	+	-	0
5	64	CDI	-	+	-	5
6	48	CDI	+	+	+	1
7	56	CDI	+	+	-	0
8	58	CDI	-	+	-	9
9	61	CDI	+	-	+	0
10	59	CDI	+	+	+	3
11	51	CDI	+	+	-	0
12	63	CDI	+	+	-	1
13	57	CDI	+	+	-	0
14	54	CDI	-	-	+	0
15	60	CDI	+	+	-	2
16	50	CDI	+	+	-	0
17	61	CDI	+	+	+	0
18	55	CDI	-	+	-	0

Tabela 2. Características das pacientes do grupo controle (sem suplementação com calcitriol), mostrando a análise histopatológica, expressão do receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR), receptor epidermal humano tipo 2 (HER2) e acometimento linfonodal. Siglas para a análise histo-patológica, carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI).

Uma análise histopatológica das amostras criopreservadas foi realizada e somente aquelas com representatividade tumoral maior ou igual a 70% foram processadas e o RNA extraído. Além disso, a determinação do perfil gênico foi realizada apenas em amostras cujo RNA extraído mostrou ser de alta qualidade. Assim, deste total de 31 pacientes, somente 17 amostras foram analisadas pela tecnologia de *microarray*, sendo que nas amostras de 3 pacientes (22, 23 e 32, destacadas em azul na tabela 1) foi feita a análise somente no produto advindo da biópsia.

III. 2. Critérios de inclusão

1. Pacientes pós-menopausadas
2. Carcinoma invasivo de mama comprovado por exame histopatológico de congelação na ocasião da biópsia incisional
3. Pacientes candidatas a tratamento cirúrgico
4. Pacientes não submetidas a tratamento neoadjuvante do câncer

Menopausa foi definida como pelo menos um ano após a última menstruação ou ooforectomia bilateral comprovada por laudo de exame histopatológico ou ultrassonografia transvaginal (desde que mais de um ano de amenorréia) (Davis, 1967) ou estrógeno sérico $\leq 13\text{pg/mL}$ (Chakravarti *et al.*, 1976) e FSH sérico em nível pós-menopausal.

III. 3. Critérios de exclusão

1. História de cálculo renal ou hipercalcemia
2. Uso atual de corticoesteróides

3. Pacientes que realizaram quimioterapia, hormônio-terapia ou radioterapia prévias
4. Pacientes que participaram de outros estudos clínicos enquanto admitido neste protocolo
5. Pacientes com doença de paratireóide
6. Pacientes que apresentavam qualquer outra condição ou terapia que possa indicar um risco à paciente ou interferir nos objetivos do estudo

III. 4. Coleta e transporte das amostras

III. 4.1. Tumor

Trinta e uma pacientes foram orientadas a iniciar o uso de calcitriol (0,25µg via oral, duas vezes ao dia) após a biópsia incisional enquanto faziam a avaliação pré-operatória e foram orientadas a continuar a suplementação após o tratamento operatório definitivo. Amostras de tumor foram colhidas antes, na biópsia, e após (no ato da cirurgia) a suplementação de calcitriol. A qualidade da amostra tumoral foi supervisionada pelo patologista. A análise histopatológica da peça cirúrgica confirmou a natureza neoplásica da lesão.

III. 4.2. Sangue

Foram coletados 15mL de sangue das pacientes (após jejum de 12 horas) antes, por ocasião da biópsia, e após suplementação de calcitriol (vitamina D), por ocasião da cirurgia. O sangue foi centrifugado e o soro estocado em freezer à -20°C até o momento da dosagem sérica de 25(OH)D₃. O material foi enviado ao Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

III. 4.2.1. Dosagem sérica de vitamina D, 25(OH)D₃

O método de determinação quantitativa da hidroxivitamina D 25 é um teste direto, competitivo, baseado no princípio de quimioluminescência (CLIA). O anticorpo específico anti-vitamina D é utilizado para revestir partículas magnéticas e a vitamina D é ligada a um derivado de isoluminol. A hidroxivitamina D 25 é desassociada da proteína de ligação e compete com a vitamina D pelos locais de ligação do anticorpo durante a incubação. O material não ligado é removido com um ciclo de lavagem depois da incubação. Os reagentes iniciadores são então adicionados para induzir uma reação de quimioluminescência. O sinal luminoso é medido por um fotomultiplicador em unidades relativas de luz (RLU) e é inversamente proporcional à concentração de hidroxivitamina D 25 existente nas amostras.

III. 5. Processamento das amostras coletadas

III. 5.1. Amostras tamponadas (para imunohistoquímica)

As amostras mantidas em formol tamponado 10% foram emblocadas em parafina e cortadas em fatias de 300-400µm. As lâminas silanizadas contendo os tecidos foram armazenadas para a realização posterior dos ensaios de imunohistoquímica para as proteínas Ki-67 e VDR.

As lâminas silanizadas foram processadas no departamento de Patologia da Faculdade de Medicina. A incubação com anticorpo anti-Ki-67 (clone MIB-1, Dako, Glostrup, Dinamarca) foi feita na concentração de 1:150 a 37°C e a revelação, feita com o sistema de detecção *Dako REAL*TM, *APAAP*, *mouse* (cat no K5000, Dako), de acordo com as instruções do fabricante.

III. 5.2. Amostras criopreservadas (para extração de RNA)

As amostras armazenadas em nitrogênio líquido foram embebidas em Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] (Sakura, Estados Unidos), resina solúvel em água que serve de matriz para o corte de tecidos em temperaturas abaixo de -10°C, e cortadas no maior diâmetro em fatias de 300µm no micrótomo-criostato (Leica, Alemanha). Foi retirado o excesso de Tissue-Tek[®] e os tecidos foram novamente armazenados em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com hematoxina-eosina (HE) e analisadas pelo médico-patologista, sendo demarcadas as áreas contendo pelo menos 70% de células tumorais. O tecido congelado, então, foi dissecado manualmente, separando-se as áreas demarcadas (tendo como guia a lâmina de HE previamente analisada) com um bisturi estéril.

III. 6. Expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica

As lâminas silanizadas foram processadas no departamento de Patologia da Faculdade de Medicina. Lâminas previamente tratadas com silane foram incubadas por 30 minutos em estufa a 90°C. O material foi desparafinado em xilol por 30 minutos a temperatura ambiente, hidratado em banhos decrescente de etanol (etanol absoluto, 95%, 80% e 70%) por 30 segundos em cada concentração. Após lavagem com água corrente e destilada, o material foi submetido à recuperação antigênica por calor e pressão, utilizando para tanto, tampão citrato 10mM, pH 6.0 em banho de vapor por 30 minutos. O material imerso no tampão citrato foi resfriado a temperatura ambiente por 20 minutos e lavado em água corrente. Seguiu-se bloqueio da peroxidase endógena com

H₂O₂ a 3% (10 vol.) em dois banhos de 10 minutos cada. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e em seguida com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos. A incubação com anticorpo anti-Ki-67 (clone MIB-1, cat no M7240, Dako) na concentração 1:150, foi feita *overnight* minutos a 37°C e a revelação foi feita com o sistema de detecção *Dako REAL™*, *APAAP mouse* (cat no K5000, Dako), de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram incubadas com 600 uL de solução substrato-cromógeno constituída de 1mg/mL de diaminobenzidina em PBS e 0,02% de peróxido de hidrogênio, pH 7.4, por 10 minutos. Após lavagem com Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos e em seguida com água corrente, foi realizada contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, seguido de banho de hidróxido de amônia 0,2% e nova lavagem em água corrente. O material foi desidratado em banhos crescentes de etanol (etanol 50%, 80%, 95% e absoluto) por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula.

A leitura das lâminas foi realizada por três observadores: observador 1 (Dr. Ricardo Basso, patologista), observador 2 (Dr. Eduardo Carneiro Lyra) e observador 3 (Dra. Ana Paula Torres, patologista).

Foram analisadas 1000 células em 45 amostras diferentes pelos três observadores e o resultado foi expresso em porcentagem de positividade. Houve correlação entre as leituras dos três observadores (obs1 x obs2, $r = 0,9$, $p < 0,001$; obs2 x obs3, $r = 0,819$, $p < 0,001$ e obs1 x obs3, $r = 0,816$, $p < 0,001$, correlação de Spearman). Determinamos então a variação das contagens entre os observadores para estimar o erro percentual. Calculamos a média das contagens, considerada como 100%, e a diferença percentual entre

a contagem do observador e a média. Calculamos a seguir, o valor médio da variação entre os três observadores para cada amostra. Determinamos a média da diferença percentual entre as contagens, que foi de 35%; a mediana, 38%; o percentil 60, 40,78%; o quartil 75, 48,28%. Esta estimativa de erro de contagem entre observadores já foi utilizada em outro trabalho do grupo (Sobral, 2008).

III. 7. Extração de RNA

O tecido criopreservado dissecado foi pulverizado com Biopulverizer (Bio-pulverizer™ BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA) uniformemente. O RNA total foi extraído com o *Rneasy mini kit* (cat no 74104, Qiagen, Alemanha), no qual ao tecido pulverizado foi adicionado 600µl de solução de lise gelado (tampão RLT contendo β-mercaptoetanol) em tubos de 1,7ml, seguido de uma centrifugação em velocidade máxima por 3 minutos a fim de evitar que debris celulares entupam a coluna.

O sobrenadante foi removido para outro tubo de 1,7ml e adicionou-se 600µl de etanol 70% DEPC, misturando-se bem com a pipeta. Esta solução foi transferida para a coluna, contendo o tubo coletor, e centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm. O eluato do tubo coletor foi descartado.

Em seguida, adicionou-se 700µl do tampão RW1 na coluna e centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm, descartando o eluato. O tampão RPE (500µl) foi adicionado à coluna e a mesma foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm. Este procedimento foi repetido e o RNA foi recuperado em um novo tubo coletor após a adição de 30 µl de água livre de RNases à coluna seguido de uma última centrifugação a 10.000 rpm por 1 minuto.

A concentração das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 e 280nm pelo espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280.

A integridade do RNA foi avaliada a partir valor do RIN (*RNA Integrity Number*), gerado pelo software do *Agilent Bioanalyzer* (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). O Bioanalyzer utiliza uma plataforma baseada na eletroforese por microcapilaridade. Durante o preparo do *chip* um corante é adicionado ao gel. Com a ajuda de uma “estação de preparação”, os canais do *chip* são preenchidos com o gel misturado com o corante, e então, este se intercala diretamente com o ácido nucléico. Como princípio, este instrumento detecta as biomoléculas pela fluorescência induzida pelo laser a 670-700nm (Schroeder *et al.*, 2006). A imagem de um eletroferograma é gerada e a qualidade das amostras é dada pelo “Número de integridade de RNA” (RIN) que traduz num algoritmo criado para extrair informação sobre a integridade da amostra de RNA a partir do eletroferograma gerado pelo software do Bioanalyzer. Este considera a distância entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S, bem como a relação 28S/18S.

III. 8. TECNOLOGIA DE CDNA MICROARRAY (TWO-CYCLE)

O RNA total foi extraído pelo protocolo do *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha). A síntese do RNA amplificado foi realizada com o *Two-cycle Target Labeling Kit*, cat. n° 900494 (Affymetrics, Santa Clara, CA, EUA) conforme protocolo do fabricante (Figura 3), bem como a hibridização e aquisição das imagens.

Figura 2. Esquema ilustrativo do primeiro e segundo ciclo de amplificação, hibridização e aquisição de imagens.

III. 8. 1. Síntese de cDNA por dois ciclos

III. 8. 1. 1. Primeiro ciclo

Síntese da primeira fita de cDNA

Num tubo de 0,2 ml colocar 100ng de RNA total, adicionando 2 μ l do controle de RNA poli-A devidamente diluído, 2 μ l de oligo (dT) T7 (50 μ M) e completar com água livre de *RNase* para um volume final de 6 μ l. Agitar cuidadosamente e minifugar. Incubar por 6 minutos a 70°C e resfriar a 4°C por 2 minutos, minifugando posteriormente. Adicionar a cada amostra 5 μ l do *mix* constituído por 2 μ l de 5x *First Strand Reaction Mix*, 0,5 μ l de nucleotídios (dNTPs, 10 mM), 1 μ l de ditioneitol (DTT, 100mM), 0,5 μ l *RNase inhibitor* e 1 μ l de *SuperScript II*. Incubar a 42°C por 1 hora, seguido de uma incubação a 70 °C por 10 minutos e resfriar a 4°C por pelo menos 2 minutos.

Síntese da segunda fita de cDNA

Adicionar a cada amostra 10 μ l do *mix* para síntese da segunda fita de cDNA (4,8 μ l de água livre de *RNase*, 4 μ l de cloreto de magnésio recém-diluído a 17,5mM, 0,4 μ l de dNTPs a 10 mM, 0,6 μ l *E.coli DNA Polymerase I* e 0,2 μ l *Rnase H*). Incubar por 2 horas a 16°C, seguido de uma incubação a 75 °C por 10 minutos e resfriar a 4°C por pelo menos 2 minutos.

Transcrição in vitro e amplificação de cRNA - MEGAscript® T7 Kit (Ambion)

Preparar para cada amostra uma mistura contendo 5 μ l de *10x reaction buffer*, 5 μ l de cada solução de ácido nucléico (solução ATP, CTP, UTP e GTP) e 5 μ l de *Enzyme Mix*. Incubar a 37°C por 16 horas.

Purificação do cRNA

Acrescentar 60µl de água livre de Rnase à reação de transcrição *in vitro* e misturar, posteriormente adicionar 350µl de tampão ligação de cRNA. Após breve mistura, acrescentar 250µl de etanol ao lisado. Pipetar várias vezes para homogeneizar. Aplicar a amostra numa coluna cRNA *Cleanup Spin Column* e acoplá-la a um tubo de coleta. Centrifugar por 15 segundos a 8.000 x g, descartando logo após o tubo de coleta. Transferir a coluna a um novo tubo e pipetar 500µl de tampão de lavagem para cRNA, repetir a centrifugação, descartando posteriormente o tubo de coleta. Realizar nova lavagem e centrifugação, acrescentando-se desta vez 500µl de etanol 80%. Secar a coluna centrifugando-a por 5 minutos com a tampa aberta na rotação máxima (25.000 x g) e adicionar 13µl de água livre de RNase diretamente na coluna para que ocorra a eluição durante a centrifugação de 1 minuto na rotação máxima. Quantificar o cRNA purificado no espectrofotômetro NanoDrop.

III. 8. 1. 2. Segundo ciclo

Síntese da primeira fita de cDNA

Partindo de 600ng de cRNA, adicionar 2µl de *Random primer* diluído (0.2 µg/µL), completando com água livre de RNase para um volume final de 11 µl. Incubar por 10 minutos a 70°C e resfriar a 4°C por 2 minutos. Acrescentar a cada amostra, 9µl da primeira mistura (4µl de 5x *First Strand Reaction Mix*, 2µl de nucleotídios (dNTPs) a 10 mM e 1µl de DTT (0,1M), 1µl de *SuperScript II*, incubando a 42°C por 1 hora, seguido de uma incubação a 4°C por 2 minutos. Adicionar 1µl de RNase H, incubando a solução a 37°C por 20 minutos,

seguido por uma incubação de 5 minutos a 95°C e resfriar a 4°C por pelo menos 2 minutos antes de acrescentar à solução 4µl de *oligo (dT) T7 primer*.

Síntese da segunda fita de cDNA

Adicionar 125 µl da segunda mistura (88µl de água livre de *RNase*, 30µl de *Second Strand Reaction Mix*, 3µl de dNTPs a 10 mM e 4µl *E.coli DNA Polymerase I*). Incubar o volume de 150µl formado por 2 horas a 16°C e em seguida adicionar 2µl de *T4 DNA Polymerase*, incubando-se a solução por mais 10 minutos.

Purificação da dupla fita formada

Adicionar 600µl de *cDNA Binding Buffer* a dupla fita de cDNA sintetizada, agitando por 3 segundos. Aplicar 500µl da amostra numa coluna *cDNA Cleanup Spin Column* acoplado ao tubo de coleta e centrifugar por 1 minuto a 8.000 x g. Descartar o conteúdo do tubo de coleta e repetir a centrifugação para o restante da amostra. Transferir a coluna para um novo tubo de coleta e adicionar à mesma 750µl do tampão de lavagem. Centrifugar por 1 minuto a 8.000 x g e descartar o conteúdo do tubo de coleta. Abrir a tampa da coluna e centrifugar por 5 minutos na rotação máxima (25.000 x g), descartando o tubo de coleta. Transferir a coluna a um novo tubo de coleta e adicionar 14µl de tampão de eluição de cDNA diretamente sobre a coluna. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto na rotação máxima (25.000 x g).

III. 8. 2. Síntese de cRNA marcado com biotina

Num tubo de 0,2 ml, colocar 12µl da dupla fita purificada. Adicionar 40µl de uma mistura de 4µl de tampão de transcrição *in vitro*, 12µl de *mix* de *NTP* e 4µl de *mix* da enzima para transcrição *in vitro* e 8µl de água livre de *RNase*. Misturar, minifugar e, posteriormente, incubar a 37°C por 16 horas. Proceder com a purificação do cRNA.

III. 8. 2. 1. Purificação do cRNA marcado com biotina

Acrescentar 60µl de água livre de *RNase* à reação de transcrição *in vitro* e misturar, posteriormente adicionar 350µl de tampão de ligação de cRNA. Após breve mistura, acrescentar 250µl de etanol ao lisado. Pipetar várias vezes para uma boa homogeneizada. Aplicar a amostra numa coluna *cRNA Cleanup Spin Column* e acoplá-la a um tubo de coleta. Centrifugar por 15 segundos a 8.000 x g, descartando logo após o tubo de coleta. Transferir a coluna a um novo tubo e pipetar 500µl de tampão de lavagem para cRNA, repetir a centrifugação, descartando posteriormente o tubo de coleta. Realizar nova lavagem e centrifugação, acrescentando-se desta vez 500µl de etanol 80%. Secar a coluna centrifugando-a por 5 minutos com a tampa aberta na rotação máxima (25.000 x g) e adicionar 11µl de água livre de *RNase* diretamente na coluna para que ocorra a eluição durante a centrifugação de 1 minuto na rotação máxima. Repetir o procedimento. Quantificar o cRNA purificado no espectrofotômetro NanoDrop.

III. 8. 3. Fragmentação do cRNA marcado com biotina para hibridização

A partir da quantificação do cRNA purificado, fragmentar 20µg, adicionando 8µl de tampão de fragmentação (5x) e completar com água livre de RNase para um volume final de 40µL. Incubar a 94°C por 35 minutos e em seguida colocar no gelo. Guardar uma alíquota para verificação no Bioanalyser.

III. 8. 4. Hibridização

Partindo-se de 15µg da amostra de cRNA fragmentado, adicionar 5µL de oligonucleotídeo controle B2 (3nM), 15µl de controle eucariótico para hibridização (20x), 150µl de tampão de hibridização (2x), 30µl DMSO e água para completar um volume final de 300µl. Aquecer a solução a 99°C por 5 minutos e então a 45° por 5 minutos. Enquanto isso, preencher o *genechip* (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix Inc., EUA) com 200µl solução de pré-hibridização e incubá-lo a 45°C por 10 minutos e 60rpm.

Substituir a solução de pré-hibridização do *genechip* por 200µl da solução contendo o cRNA fragmentado e incubar o *genechip* em um forno de hibridização a 45°C numa rotação de 60rpm por 16 horas.

Seguindo o protocolo as lâminas foram lavadas, digitalizadas e analisadas conforme Affymetrix GeneChip Scanner 3000 e os softwares *Affymetrix GeneChip Operating* (GCOS) e MeV (MultiExperiment Viewer) versão 4.5.1.

III.9. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de cRNA amplificado no primeiro ciclo devido à quantidade insuficiente de RNA total dos tumores (menos que 1 µg de RNA em algumas amostras).

Foram utilizados, para um volume final de 20 µL por amostra, 4 µL tampão de síntese de primeira fita (5X) (Invitrogen, cat. Y00146), 0,2 mM DTT (Invitrogen, cat. Y00147), 10mM dNTP Set (Invitrogen, cat. 10297-018), 3 µg *Random Primers* (Invitrogen, cat. 48190-011), *Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, cat. 15518-012) e *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, cat.11733-046). Primeiramente, essa solução foi incubada a 42°C por uma hora, sendo acrescentado mais 1µL de *SuperScript III Reverse Transcriptase* por amostra, seguido por mais uma hora de incubação a 42°C.

A inativação da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* foi feita submetendo o cDNA recém sintetizado a 85°C por 5 minutos e a remoção da fita de RNA presente em fitas híbridas RNA:DNA foi feita adicionando-se 1µL de *RNase H* (Invitrogen, cat. 18021-071) em cada amostra, seguida por incubação a 37°C por 20 minutos.

III.10. Real time PCR (qRT-PCR)

A quantificação relativa dos transcritos diferencialmente expressos no *microarray* foi feita por PCR em tempo real utilizando o cDNA sintetizado a partir de cRNA amplificado no primeiro ciclo, conforme descrito anteriormente.

Foram selecionados doze genes cuja expressão após a suplementação com calcitriol encontrou-se aumentada em ambas análises estatísticas feitas

(SAM, *Significant Analysis of Microarrays* e *RankProd*) dos genes diferencialmente expressos.

Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para a amplificação dos transcritos *ATF3*, *CXCL2*, *DUSP1*, *EGR1*, *EGR2*, *FOS*, *FOSB*, *G0S2*, *MMP12*, *PTGS2*, *RGS1* e *THBS1* com o auxílio do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_wwww.cgi), a fim de gerar produtos específicos entre 100 e 200 pb (tabela 3). A especificidade dos *primers* foi verificada através da ferramenta de alinhamento online BLAT (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) e o *software* OligoTech versão 1.0 (1995) foi utilizado para conferência de possíveis formações de estruturas secundárias.

Gene	Número de acesso Genebank	Primer direto	Primer reverso	Tamanho do produto (pb)
<i>ATF3</i>	NM_001674	5' GAAAAAGAGGCGACGAGAAA 3'	5' GCTGCTTCTCGTTCTTGAGC 3'	158
<i>CXCL2</i>	NM_002089	5' CTCAAGAATGGGCAGAAAGC 3'	5' CTTCAAGGAACAGCCACCAAT 3'	134
<i>DUSP1</i>	NM_004417.3	5' TGCTGAAAACAAACCTGCTT 3'	5' TTCCCGACGACACATATACA 3'	167
<i>EGR1</i>	NM_001964	5' CAGCACCTTCAACCCTCAG 3'	5' GTCTCCACCAGCACCTTCTC 3'	108
<i>EGR2</i>	NM_000399	5' GGTGACCATCTTTCCCAATG 3'	5' CCAACGACCTCTTCTCTCCA 3'	110
<i>FOS</i>	NM_005252	5' CCGGGGATAGCCTCTCTTAC 3'	5' GTGGGAATGAAGTTGGCACT 3'	121
<i>FOSB</i>	NM_006732	5' TCTGTCTTCGGTGGACTCCT 3'	5' GAAGAGATGAGGGTGGGTTG 3'	159
<i>G0S2</i>	NM_015714	5' GAGAGGAGGAGAACGCTGAG 3'	5' ATCAGCTCCTGGACCGTTT 3'	152
<i>MMP12</i>	NM_002426	5' CAAGGAATCGGGCCTAAAT 3'	5' TGCTTTTCAGTGTTTTGGTGA 3'	127
<i>PTGS2</i>	NM_000963	5' ATCACAGGCTTCCATTGACC 3'	5' CTCCACAGCATCGATGTCAC 3'	166
<i>RGS1</i>	NM_002922	5' CCCAAAGGAATTGAAAGGAA 3'	5' TCCAGAGATTGAGACCATTGC 3'	195
<i>THBS1</i>	NM_003246	5' CAATGCCACAGTTCCTGATG 3'	5' ATCGGTTGTTGAGGCTATCG 3'	161
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	5' CTGCCAACGTGTCAGTGGTG 3'	5' CAGTGTGGTGGGGGACTGAG 3'	400

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação dos transcritos selecionados para validação por PCR em tempo real.

A amplificação e detecção dos fragmentos amplificados foram feitas utilizando-se *Rotor-Gene 6 System* (Corbett Research, Mortlake, Sydney,

Austrália). A geração de produtos específicos foi monitorada para cada jogo de *primers* em gel de agarose 2%.

As condições de reação para cada par de *primer* foram definidas após testes com diferentes diluições de cDNAs (1,25ng – 10ng) e diferentes temperaturas de anelamento (57-60°C). O reagente *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, cat. 11733-046) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram feitas em duplicata para cada amostra e sempre contendo o gene utilizado como referência (*GAPDH*). A média dos valores de ciclos limiares de cada amostra (Ct) foi utilizada para quantificação da expressão dos genes de interesse. A variação entre os Ct das reações em duplicata não excedeu 1,5 ciclo.

III.10.1. Análise dos resultados de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real

Para o cálculo da eficiência, foram utilizadas cinco diferentes quantidades de cDNA obtidas por meio de diluição seriada da amostras de cDNA original (1,25ng – 10ng), que foram sintetizadas a partir de 1µg de cRNA amplificado após a transcrição *in vitro* no 1º ciclo de amplificação do kit *Two-cycle Target Labeling*.

Como a eficiência de todos os pares de primer utilizados foi próximo de 100%, optamos por utilizar o seguinte cálculo para expressão relativa:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{onde,}$$

Ct = ciclo de início de quantificação do transcrito

ΔCt = Ct do gene de interesse menos o Ct do gene referência (*GAPDH*)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ médio da amostra de interesse menos ΔCt médio da amostra referência.

III.11. Estatística

As variáveis foram testadas quanto à sua distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk. Em caso de distribuição normal, foram utilizados os testes t ou t pareado e correlação de Pearson. Caso contrário, foram utilizados testes não-paramétricos. O nível de significância foi menor ou igual a 0,05. A associação entre frequências foi analisada utilizando-se os testes de distribuição de chi-quadrado ou exato de Fisher.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV. 1. Determinação da expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica

Foi feita a determinação da expressão de Ki-67 em um grupo controle, sendo nove (50%) dentre dezoito foram consideradas positivas para Ki-67 (presença da marcação para Ki-67 em pelo menos 10% das células contadas, **tabela 4**). Houve uma tendência a menor expressão de Ki-67 em amostras provenientes da cirurgia, comparadas às da biópsia ($p = 0,053$, teste de Wilcoxon) (**Figuras 3 e 4**).

Neste estudo, comparamos a expressão da proteína Ki-67 antes e após a suplementação com vitamina D (calcitriol). Dezesete amostras (17/27, 62%) pré-suplementação apresentavam índice de proliferação maior que 10%, das quais treze ainda permaneceram com este índice após a suplementação com calcitriol (**tabela 5**). Considerando como limiar de resposta o valor de redução de expressão de Ki-67 na amostra pós-suplementação de 40,78% (percentil 60 do erro percentual), doze pacientes seriam consideradas como não responsivas e quinze como responsivas.

No grupo calcitriol, observamos queda da expressão de Ki-67 nas amostras colhidas pós-suplementação ($p = 0,001$, teste-t pareado) (**Figuras 5 e 6**). Adicionalmente, não houve associação entre as condições de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona assim como os tipos histológicos, e a classificação das pacientes em responsivas ou não-responsivas ($p > 0.05$, teste Exato de Fisher). Entretanto, houve associação direta entre ausência de expressão de HER2 e a resposta à intervenção ($p = 0,021$, teste Exato de Fisher).

Figura 3. Expressão de Ki-67 em amostras do grupo controle. Amostras de câncer de mama da biópsia (1) e do produto da cirurgia (2) foram obtidas de pacientes que não realizaram suplementação de calcitriol. O valor representa a média da contagem de dois observadores (1: $10,7 \pm 8,6$; 2: $11,8 \pm 10,8$. $p = 0,053$, teste de Wilcoxon). Somente as amostras provenientes das pacientes C1 e C11 apresentaram uma redução no índice do marcador de proliferação Ki-67.

Grupo controle

Amostra	Média entre observadores para Ki-67 - Biópsia	Média entre observadores para Ki-67 - Cirurgia	Variação média Pré - Pós
C1	12,23	0,45	96,3
C2	0,3	24,57	-8088,9
C3	0,2	0,67	-233,3
C4	7,3	20,63	-182,6
C5	3,07	5,87	-91,3
C6	28,4	36,0	-26,8
C7	11,9	9,8	17,6
C8	18,6	33,3	-79,4
C9	7,7	9,2	-20
C10	10,5	8,7	16,6
C11	23,8	2,50	89,5
C12	18,3	16,8	8,2
C13	13,3	23,2	-74,6
C14	6,4	6,1	5,5
C15	26,95	26,45	1,9
C16	8,25	12,35	-49,7
C17	6,75	13,5	-100,0
C18	0,1	0,2	-100
C19	6,3	0,3	94,7
C20	0,17	7,7	-4540,0
C21	2,3	9,0	-295,6
C22	2,0	12,2	-501,6
C23	5,0	6,2	-23,3

Tabela 4. Expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica em amostras provenientes da biópsia e da cirurgia de pacientes que não receberam a suplementação de calcitriol. As lâminas foram lidas por 3 observadores (obs. 1, obs. 2 e obs.3) e a porcentagem de células positivas para a proteína Ki-67 foi obtida após a contagem de 1000 células. Considerando o limiar de resposta estabelecido em 40,78%, somente as pacientes C1, C11 e C19 seriam classificadas como responsivas.

Imunohistoquímica - Grupo Controle

Figura 4. Expressão de Ki-67 por imunohistoquímica em amostras de câncer de mama no grupo controle da biópsia e do produto da cirurgia de pacientes que não realizaram suplementação com calcitriol.

Dosagem de 25(OH)D₃ sérica

Determinamos a concentração sérica de 25(OH)D₃ de 25 pacientes antes do início da suplementação. Sete e três pacientes apresentaram insuficiência (< 20ng/mL) e suficiência (>30ng/mL) respectivamente, mas a maioria delas apresentou uma insuficiência relativa (21-29 ng/mL) (n=15).

Imunohistoquímica - Grupo Calcitriol

Figura 5. Expressão tumoral percentual de Ki-67 antes e após suplementação de calcitriol. Foram obtidas amostras de câncer de mama durante a biópsia (pré-suplementação) e na cirurgia da mama (pós-suplementação). As pacientes receberam suplementação de calcitriol neste período, verificando-se uma redução da expressão de Ki-67 significativa ($p = 0,001$, teste t pareado).

Imunohistoquímica - Grupo Calcitriol

Figura 6. Expressão de Ki-67 em amostras pareadas de câncer de mama antes e após suplementação de calcitriol.

Grupo calcitriol

Amostra	Média entre observadores para Ki-67 Pré	Média entre observadores para Ki-67 Pós	Varição média Pré - Pós
10	8,95	2,15	76%
13	36,1	1,45	96%
14	4,4	1,25	72%
15	39,15	5,85	85%
16	29,25	4,25	85%
17	2,45	0,3	88%
18	28,25	0,05	100%
19	12,95	5,1	61%
20	3,9	4	-3%
21	25,15	11,75	53%
22	26,1	16,95	35%
23	7,9	12,85	-63%
24	1,05	2,5	-138%
25	3,65	11,45	-214%
26	4,55	1,1	76%
27	16,1	13,15	18%
28	13,9	16,1	-15,8%
29	4,7	1,6	65%
30	8,6	4,4	49,2%
32	nd	nd	Nd
33	22,35	21,75	3%
34	15,4	16,95	-10%
35	29,3	15,65	46,6%
36	nd	nd	Nd
38	nd	nd	Nd
39	28,15	10,9	61%
40	28,95	26,1	10%
41	19,05	9,35	51%
42	40,2	23,8	40,71%
43	16,0	16,1	-0,4%

Tabela 5. Expressão da proteína Ki-67 por reação de imunohistoquímica antes e após a suplementação de calcitriol. As reações foram lidas por 3 observadores (obs. 1, obs. 2 e obs.3) e a porcentagem de células positivas para a proteína Ki-67 foi obtida após a contagem de 1000 células. A variação entre a média pré e pós- suplementação foi calculada e as pacientes foram categorizadas em responsivas (redução maior que 40,78%, percentil 60) e não-responsivas (redução menor que 40,78%, destacadas em vermelho na tabela). “nd”, não determinado.

IV. 2. Análise da expressão gênica por *cDNA microarray*

IV. 2. 1. Amplificação das amostras de RNA total

Partimos de 100ng de RNA total (Figura 7) de amostras provenientes da biópsia e do produto de cirurgia para realizar a amplificação do RNA (*Two-cycle target labeling kit*). A concentração das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 e 280nm pelo espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280 (**Tabela 6**).

A integridade do RNA foi avaliada a partir valor do RIN (*RNA Integrity Number*), gerado pelo software do *Agilent Bioanalyzer* (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). O Bioanalyzer utiliza uma plataforma baseada na eletroforese por microcapilaridade. A imagem de um eletroferograma (**figura 7**) é gerada e a qualidade das amostras é dada pelo “Número de integridade de RNA” (RIN). O RIN varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. A maioria das amostras selecionadas para utilização na técnica de *cRNA microarray* apresentaram um RIN mínimo de 6,0. Cinco amostras apresentaram o número de integridade entre 4,8 e 6,0 (amostra 26CAT, 16 e 17, tabela 3), entretanto isso não reduziu a porcentagem de transcritos hibridizados no *genechip* (**Tabela 7**).

Caso	260/280	Concentração (ng/μl)	RNA total (μg)	RIN (RNA integrity number)
15CA	2,08	57	3,87	7,1
15CAT	2,03	13,2	0,86	6,0
16CA	2,09	835,7	41,79	4,9
16CAT	1,98	69,9	3,5	5,8
17CA	1,98	331,6	11,61	5,2
17CAT	1,93	393,7	19,69	5,6
21CA	2,1	1140,6	57	7,5
21CAT	2,09	748,5	37,43	6,3
22CA *	2,02	200,6	6,02	9,1
23CA *	2,01	47,6	1,43	7,9
26CA	2,05	33,5	0,95	7,4
26CAT	2,08	210,5	10,31	4,8
27CA	2,02	155,1	4,03	8,4
27CAT	2,02	142,8	3,71	7,7
28CA	2,05	188,8	13,83	2,7
28CAT	2,02	198,4	11,72	2,9
29CA	2,28	17,5	0,88	6,1
29CAT	2,12	691,1	34,57	6,4
30CA	2,01	87,6	2,37	8,4
30CAT	1,97	232,2	6,04	8,5
31CA	2	28,2	1,41	2,9
31CAT	2,06	60,5	3,03	5,7
32CA *	2,02	187,8	5,6	8,9
33CA	1,97	85,2	5,63	8,9
33CAT	2,04	131,2	2,56	8,9
34CA	2,0	135,9	3,53	8,5
34CAT	1,97	253,8	6,56	8,8
35CA	2,04	658,8	19,8	9,4
35CAT	2,01	294,5	8,6	9,3
36CA	2,05	271,9	6,8	9,4
36CAT	2,06	329,2	20,35	7,7
38CA	1,97	91,1	2,46	8,1
38CAT	2,0	267,7	7,23	9,1
41CA	2,01	89,4	2,59	9,4
41CAT	2,04	220,0	6,38	9
42CA	2,04	611,4	17,73	9,3
42CAT	2,07	108,3	2,71	8,6
43CA	2,1	355,2	8,88	9,3
43CAT	2,08	184,7	4,62	8,8

* Somente a amostra proveniente da biópsia foi coletada

Tabela 6. Características do RNA extraído das amostras. A quantificação do ácido nucleico foi feita no Nanodrop e a qualidade do RNA foi verificada no Bioanalyser. Amostras destacadas em vermelho não foram utilizadas para análise de microarray por apresentar o “número de integridade de RNA” muito abaixo do limiar de 6,0. “CA”, pré-suplementação; “CAT”, pós-suplementação.

Figura 7. Integridade do RNA extraído das amostras. O eletroferograma mostra 2 picos que representam as frações 18S e 28S respectivamente. O RIN (*RNA integrity number*) varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. A maioria das amostras selecionadas apresentava RIN > 6,0.

IV. 2. 2. Hibridização dos *chips* de cDNA *microarray*

As sondas de cRNA fragmentado e marcado com biotina foram adicionadas à solução de hibridização, e então, aplicadas nos *chips* de cDNA *microarray* (“lâmina” de cDNA *microarray*).

O *chip* de cDNA *microarray* utilizado foi o *Human Genome U133 Plus 2.0* (cat n°520019) (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, EUA) Os *GeneChip probe arrays* foram construídos utilizando uma tecnologia que combina fotolitografia e química combinatória (*Expression Analysis Technical Manual*, pg 16). O *chip* de cDNA *microarray* apresenta cerca de 47.000 transcritos e variantes, dentre os quais 38.500 correspondem a genes humanos bem caracterizados. Cada oligonucleotídeo (*probe*) está localizado em uma região específica denominada *probe cell* a qual contém centenas de milhares a milhões de cópias de um oligonucleotídeo específico (*probe*). Cada transcrito está representado por 11 pares de oligonucleotídeos de 25 mer cada, designados PM (*perfect match*-emparelhamento completo) e MM (*mismatch*- emparelhamento incompleto) distribuídos em diferentes regiões do *genechip* (**figura 8**). Entre os PM há uma hibridização perfeita e completa entre o oligonucleotídeo (*probe*) e o cRNA alvo, contudo, no MM, há um desapareamento, pois a 13^a base não condiz àquela presente no cRNA alvo. Esta característica do MM aponta para a avaliação das ligações não específicas e *background* dentro do sistema Affymetrix de análise. Por fim, os transcritos estão representando a porção próxima a cauda poli-A do RNAm , pois esta região é mais facilmente convertida em alvo marcado com biotina (Robinson *et al.*, 2007).

Figura 8. Representação esquemática do *probe set* constituído por 11 pares de *probes* representando diferentes regiões do transcrito após processamento da imagem. O *chip* de cDNA *microarray Human Genome U133 Plus 2.0 array* contém 54.000 *probe sets*. PM= emparelhamento completo e MM= emparelhamento incompleto.

IV. 2. 2. 1. Parâmetros de qualidade dos dados gerados pelo array

Os *genechips* foram analisados no *Scanner (GeneChip® Scanner 3000)* para avaliar a intensidade de hibridização. Os sinais gerados pela hibridização dos cRNA fragmentados e biotinilados das amostras às sequências presentes nos *chips* de *microarray* foram capturadas utilizando-se um scanner a laser, cujo valor do pixel é de 3 µm e o comprimento de onda de 570 nm. O programa de aquisição das imagens é dado pelo *GeneChip® Operating Software (GCOS)*. O *GeneChip® Operating Software (GCOS)* permite a localização dos pontos de cRNA hibridizados no *chip* basendo-se em marcadores de posição, como o Oligo B2, o qual atua como um controle positivo no qual o sinal de sua hibridização indica as bordas do array (*Data Analysis Fundamentals*, pg 36). O controle do gradeamento faz-se através da formação de um quadrado padrão nas quatro bordas da imagem (**Figura 9A**) e do nome *GeneChipHG-U133Plus 2*. (**Figura 9B**).

Este software além de avaliar a eficiência da hibridização das amostras nas lâminas também mostra a eficiência do processo de marcação do cRNA com biotina e a qualidade do RNA em si.

Figura 9. Controle de hibridização do *array* de acordo com a imagem gerada pelo controle Oligo B2: bordas com intensidades alternadas e o quadrado padrão em cada canto (A) e a formação do nome do *array* (B).

O controle da hibridização é composto por uma mistura de transcritos cRNA biotina-marcados oriundos de *E. coli* denominados bioB, bioC, bioD, bem como um gene recombinante derivado do bacteriófago P1 denominado *cre*, preparados em diferentes concentrações e inseridos na solução de hibridização. O bioB refere-se ao nível de sensibilidade do ensaio, devendo estar presente em pelo menos 50% das vezes em cada ensaio, já o bioC, bioD e *cre* devem estar presente em todas as lâminas de cada ensaio e numa concentração crescente.

Foram verificados os valores médios de intensidade de fundo (*background*) e ruído (*noise*). A intensidade de fundo é calculada a partir da divisão do *array* em 16 regiões retangulares de tamanho igual, no qual os valores de menor intensidade (2%) são medidos em cada região e a média dessa intensidade é calculada. Para o cálculo do ruído, as mesmas regiões são usadas, são selecionados os 2% menores valores de *background* e o

desvio padrão desses valores são as zonas de ruído. Segundo o fabricante, os valores de *background* aceitáveis variam entre 20-100 e o ruído deve ser menor que 5,0 para arrays processados no GeneChip® Scanner 3000. Para as amostras selecionadas para a técnica de cDNA *microarray*, esses valores são mostrados na **Tabela 6**. Adicionalmente, a porcentagem de *probes* presentes indica a qualidade da amostra e depende do tipo celular, de estímulos biológicos e do tipo do array. Para nosso estudo, a porcentagem de *probes* aceita para análise varia entre 40-60%. Nestas amostras, todos estes parâmetros foram satisfeitos, como mostra a **tabela 6**.

Outro parâmetro é a colocação de uma mistura de transcritos de cRNA oriundos de *E. coli* marcados com biotina inseridos na solução de hibridização (bioB, bioC, bioD) para avaliar sua eficiência, bem como um gene recombinante derivado de bacteriófago P1, denominado *cre*. O valor do sinal desses genes (controles de hibridização) na razão 3'/5' não deve exceder 3,0. Nossas amostras estão de acordo com estes parâmetros (**Tabela 7**).

Controles internos mostram a qualidade da amostra de RNA através da relação 3'/5' para os genes da actina e *GAPDH* em cada lâmina de *microarray*, razão que não deve ultrapassar o valor 3 e que apresenta valor mais elevado quando o *Two-cycle amplification kit*.

Amostra	Intensidade de fundo (<100)	Ruído (<5,0)	% Presentes
15CA	40,19	2,03	46,2
15CAT	36,97	1,7	37,8
16CA	36,5	1,97	50,7
16CAT	34,35	1,66	47,5
17CA	40,12	2,13	55,8
17CAT	35,89	1,86	55,9
21CA	41,83	2,23	52,1
21CAT	39,62	1,97	55,8
22CA	44,25	2,34	46,7
23CA	40,32	1,9	47,3
26CA	39,69	2,06	51,1
26CAT	38,53	2	52,3
27CA	39,37	2,13	49,5
27CAT	40,32	2,08	49,8
29CA	36,15	1,55	56,4
29CAT	38,95	2,17	56,6
30CA	38,27	2,03	51,3
30CAT	38,48	2	51
32CA	37,94	1,79	46,4
33CA	39,63	2,07	48,8
33CAT	31,09	1,29	46,2
34CA	37,38	1,93	48,2
34CAT	38,6	2,04	46,1
35CA	35,57	1,64	50,4
35CAT	32,02	1,31	48,2
36CA	40,68	2,14	47,6
36CAT	35,83	1,76	45,6
38CA	41,89	2,26	49,8
38CAT	40,98	2,06	48,7
41CA	41,18	2,19	48,3
41CAT	41,93	2,27	49,2
42CA	37,39	1,93	46,5
42CAT	39,07	1,99	50,7
43CA	47,07	2,63	50,6
43CAT	41,05	2,27	51,5

Tabela 7. Qualidade dos dados gerados pelos *arrays*. Verificação da intensidade de fundo, do ruído e da porcentagem de *probes* presentes nos *arrays* hibridizados. Na coluna “amostra”, o número representa a identificação da amostra, “CA” é a designação para amostra proveniente da biópsia (pré-suplementação) e “CAT”, a designação para amostra proveniente da cirurgia (pós-suplementação).

Razão 3' / 5'

Amostra	Controles de hibridização <3,0			
	BioB	BioC	BioD	Cre
15CA	0,97	1,45	1,65	1,09
15CAT	0,71	1,64	1,60	1,15
16CA	0,91	1,39	1,76	1,05
16CAT	0,84	1,34	1,77	1,13
17CA	0,89	1,61	1,53	0,09
17CAT	0,86	1,28	1,54	1,04
21CA	0,92	1,53	1,68	1,07
21CAT	0,88	1,37	1,44	1,07
22CA	0,72	1,48	1,65	1,1
23CA	0,84	1,26	1,49	1,09
26CA	0,94	1,32	1,74	1,03
26CAT	0,81	1,28	1,7	1,1
27CA	1	1,35	1,85	1,07
27CAT	1,07	1,39	1,98	1,07
29CA	0,9	1,34	1,54	1,07
29CAT	0,89	1,5	1,61	1,1
30CA	0,91	1,34	1,8	1,08
30CAT	0,91	1,49	1,75	1,08
32CA	0,9	1,26	1,55	1,06
33CA	0,82	1,48	1,56	1,05
33CAT	0,88	1,44	1,54	1,03
34CA	0,93	1,36	1,89	1,06
34CAT	0,75	1,31	2,08	1,04
35CA	0,74	1,45	1,71	1,12
35CAT	0,83	1,33	1,75	1,09
36CA	0,87	1,51	1,61	1,09
36CAT	0,87	1,53	1,63	1,09
38CA	0,82	1,52	1,55	1,09
38CAT	0,87	1,35	1,51	1,12
41CA	0,81	1,59	1,75	1,05
41CAT	0,87	1,3	2	1,07
42CA	0,79	1,41	1,92	1,1
42CAT	0,86	1,29	1,8	1,09
43CA	0,87	1,31	1,9	1,09
43CAT	0,76	1,38	1,69	1,01

Tabela 8. Parâmetros para os valores gerados pelo cDNA *microarray* para os controles de hibridização (razão 3' / 5' < 3,0).

No sistema da Affymetrix as intensidades da PM e MM são utilizadas em conjunto para produzir um valor de expressão biologicamente significativo e correção do background (PM-MM). O algoritmo de detecção do sistema Affymetrix, baseia-se no método PM-MM para determinar a porcentagem de transcritos presentes. Simplificadamente, calcula-se uma razão **R** (*discrimination score*) para cada par de *probes* e compara-se a um limite pré-estabelecido (*predefined threshold*):

$$R = \frac{PM-MM}{PM+MM}$$

Onde, **R** discrimina uma propriedade básica da habilidade de detectar o transcrito alvo. Ele mede a intensidade específica do par de probes (PM-MM) com a intensidade total da hibridização (PM+MM).

Faz-se um ranqueamento dos valores das PM e MM de 1 a 10 referentes aos 10 pares presentes no *probeset*, e aplica-se o teste de Wilcoxon's (*One-Sided Wilcoxon's Signed Rank*). O valor de *p* encontrado (*p-value*) irá delinear se o transcrito está presente (exemplo: $p < 0,04$), ausente (exemplo: $p > 0,06$) ou marginalmente presente (exemplo: $0,04 < p < 0,06$) (*Data Analysis Fundamentals Manual-Affimetrix*, pg 42).

IV. 2. 3. Normalização das intensidades dos Chips de cDNA microarray

O algoritmo utilizado para normalização foi o *Robust Multichip Averaging* (RMA), introduzido por Irazarry *et al.* (2003) e disponibilizado pelo projeto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>), desenvolvido para análise de dados de microarray em linguagem de programação R. Este algoritmo executa a

correção do ruído de fundo (*background correction*), a normalização dos dados e a *probe summarization* para converter os níveis de intensidade dos *probes* em valores de expressão de genes. Para tanto, ele utiliza arquivos “.cel”, ou seja, arquivos sem nenhuma correção prévia.

Correção do ruído de fundo baseia-se nos pares de nucleotídeos designados *PM*, isto é, considera somente a hibridização realizada nas *PM* para correção do ruído de fundo. Para tanto, a observação chave dá-se pela distribuição dos valores da intensidade de hibridização em escala logarítmica ($\log_2(PM)$) em seu histograma. Neste histograma a distribuição da intensidade à esquerda da moda apresenta-se similar à distribuição da curva normal. Entretanto, esta curva se prolonga muito mais à direita, sugerindo que a hibridização das *PM* à direita está relacionado com hibridizações não-específicas e ruído de fundo, o que não ocorre ao lado oposto da curva. Sendo assim, o pico do histograma seria a estimativa da média do ruído de fundo o qual pode ser subtraído de todos, o valor da intensidade das *PM* para correção do ruído de fundo.

A normalização utilizada é a *quantile* que utiliza a intensidade bruta de todas as lâminas para construir a intensidade média de todos os *probes* (Bolstad *et al.*, 2003). Este assume que todas as lâminas possuem uma distribuição idêntica de sua intensidade independente de sua variância. E a *probe summarization* utiliza a *Median Polish* de Tukey para seguir o modelo linear nos dados já corrigidos e normalizados convertidos para o log de base 2 a fim de estimar o real valor da expressão dos genes (**Figura 10**).

Figura 10. Expressão global relativa por amostra de todos os genes representados no chip. **Antes da normalização com o algoritmo RMA:** (A) todas as amostras pareadas pré e pós-suplementação e (B) amostras de pacientes pré-suplementação com calcitriol consideradas responsivas ou não-responsivas. **Após a normalização:** (C) as amostras pareadas pré e pós-suplementação e (D) amostras de pacientes pré-suplementação com calcitriol consideradas responsivas ou não-responsivas. Eixo Y: intensidade do sinal, eixo X: amostra

O *Principal Component Analysis* (PCA) é um método de redução da variável que utiliza o alinhamento de vetores com a direção da máxima variância para mostrar toda a variação existente na amostra. Isto permite observar a separação entre grupos e replicatas. Assume-se que amostras sob uma mesma condição experimental irão apresentar agrupamento semelhante.

Entretanto, a semelhança entre a mesma amostra, diferindo apenas na suplementação (pré e pós) foi mais importante do que a condição experimental avaliada. Assim as amostras pré e pós-suplementação da mesma paciente se agruparam, como observado na **figura 11A**, sendo que somente o par representando a paciente 21 encontrou-se mais afastado (amostras sinalizadas com uma seta na respectiva figura).

Agora, ao analisarmos somente as amostras pré-suplementação de todas as pacientes, houve uma distribuição espacial no gráfico em 3D distinta para as amostras consideradas não-responsivas (na **figura 11B**, em vermelho) das amostras consideradas responsivas (**figura 11B**, em azul).

Figura 11. Agrupamento de amostras de acordo com a análise *Principal Component*:

(A) As amostras de pacientes antes e após a suplementação foram agrupadas, na maioria dos casos, próximas (somente os pares das amostras 15 e 21 ficaram mais afastadas), (B) Utilizando somente amostras pré-suplementadas, observou-se uma distinção espacial entre o grupo de pacientes consideradas responsivas e não-responsivas.

IV. 2. 4. Filtragem dos genes de acordo com a expressão

Biologicamente, em um *genechip* contendo aproximadamente 54.000 probe sets, representando quase 40.000 genes descritos, não é esperado que todos os genes sejam expressos em níveis detectáveis, uma vez que a maioria dos tecidos apresente somente 30-40% dos genes expressos (Su *et al.*, 2002).

Além disso, espera-se que somente uma pequena fração seja de genes diferencialmente expressos sob condições experimentais diferentes, levando a um aumento no número de genes falso-positivos e a uma diminuição na sensibilidade de detecção de genes realmente diferencialmente expressos (Calza *et al.*, 2007).

Assim, optamos por realizar uma filtragem prévia dos 54.000 probe sets por variância, na qual há a remoção dos probes que possuem baixa variação de expressão entre as diferentes condições. Os *probes* são “ranqueados” de acordo com o desvio padrão e os probes que apresentaram maior variância (15%, ou seja, os 8.201 probes que apresentaram maior diferença na expressão após a suplementação com calcitriol) foram filtrados para análise posterior.

IV. 2. 5. Efeito da suplementação de calcitriol no perfil transcricional de pacientes pós-menopausadas com câncer de mama

Um dos nossos objetivos era avaliar a expressão gênica modulada pela suplementação de calcitriol através da análise de amostras coletadas antes e após a intervenção. Outro objetivo foi determinar a expressão gênica de

amostras consideradas responsivas e não-responsivas à suplementação de calcitriol. Para estas análises, utilizamos o software *MeV* versão 4.0. As amostras foram separadas em dois grupos (**Tabela 9**) e análises diferentes, foram feitas:

Grupo	Amostras	Número da amostra
I Pré x Pós- suplementação	Todas pareadas n = 14	15, 16, 17, 21, 26, 27 , 29, 30, 33 , 34 , 35, 41, 42, 43
II Resposta x Não-resposta	Somente amostras pré- suplementadas com calcitriol n = 16	15, 16, 17, 21, 22 , 23 , 26, 27 , 29, 30, 33 , 34 , 35, 41, 42, 43

Tabela 9. Agrupamento das amostras segundo a suplementação de calcitriol. Grupo I, comparação entre as amostras antes e após a suplementação com calcitriol. Grupo II, comparação entre as amostras consideradas responsivas (redução da porcentagem de células positivas com o marcador de proliferação celular Ki-67 maior que 40,78%) e não-responsivas (redução menor do que 40,78%). Amostras destacadas em vermelho foram classificadas como não-responsivas.

IV. 2. 5. 1. Efeito da suplementação de calcitriol no perfil transcricional de pacientes pós-menopausadas com câncer de mama – Grupo I

Nossa primeira análise foi verificar o efeito do calcitriol no perfil transcricional de amostras provenientes das pacientes que receberam suplementação com vitamina D. Assim, comparamos o perfil gênico das pacientes antes e após o período de suplementação.

A seguir, foram aplicados dois testes estatísticos, SAM (*Significant Analysis of Microarrays*) e RankProd, ambos pareados, para comparação das amostras nas condições de pré e pós-suplementação. Para a análise dos genes diferencialmente expressos pela metodologia SAM, foram utilizadas todas as permutações possíveis (16.384 permutações), sendo 0,61 o valor de delta adotado e FDR (*false discovery rate*) de 10,4%, resultando em 48 *probes* diferencialmente expressos positivamente (representando 35 genes conhecidos) (**Anexo I**). Inicialmente analisamos a expressão de VDR e CYP24A1 em cada amostra tumoral individualmente e observamos que ambas mantiveram-se inalteradas após a suplementação com calcitriol, como mostra a

Figura 12. Expressão dos genes VDR (receptor de vitamina D) e CYP24A1 (24-hidroxilase) antes e após a suplementação com calcitriol. Os valores mostrados correspondem à intensidade de sinal de cada transcrito no *microarray* normalizado por RMA. Não houve diferença de expressão após a suplementação com calcitriol desses transcritos. Marcação em vermelho correspondem às amostra pré-suplementação e azul, às amostras pós-suplementação.

A clusterização hierárquica das amostras utilizando estes 48 probes não resultou na separação das mesmas seguindo o critério de suplementação de calcitriol (pré e pós-suplementação), sendo muitas amostras agrupadas lado-a-lado com o respectivo par (figura 13).

Figura 13. Clusterização hierárquica de amostras pré e pós-suplementação de calcitriol. Foram identificados 48 *probes* diferencialmente expressos pela análise SAM. As amostras obtidas da mesma paciente agruparam-se lado-a-lado.

Além do teste estatístico SAM, os dados de expressão diferencial gerados pelo *microarray* foram analisados pelo teste RankProd. A determinação do nível de significância foi realizada com todas as permutações possíveis (16.384 permutações), um *cut-off* do valor de alfa de 0,01 e FDR $\leq$ 5%. Obtivemos desta análise 81 *probes* upregulados e 51 *probes* downregulados, representando 54 e 24 genes conhecidos, respectivamente (**Anexo IIa e IIb**).

Esses *probes*, tanto os hiper- (**figura 14A**) quanto os hiporegulados (**figura 14B**) também não agruparam as amostras de acordo com a suplementação e pelo método de reamostragem *bootstrap* as amostras no dendograma não se reclassificaram segundo índices de confiança aceitáveis, conforme mostra a **figura 14**.

Figura 14. Clusterização hierárquica das amostras pré e pós-suplementação de calcitriol segundo a expressão gênica diferencial determinada após análise pelo teste RankProd. **(A)** Genes cuja expressão mostrou-se aumentada e **(B)** diminuída após a suplementação com calcitriol.

Dentre os genes identificados pelas análises SAM e RankProd, foram encontrados 24 *probes* diferencialmente expressos em comum, conforme mostra na **tabela 10**.

RefSeq	Gene	Nome do gene	Fold change (Pós/Pré)
NM_006732	<i>FOSB</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	2.95
NM_005746	<i>PBEF1</i>	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	2.94
NM_004657	<i>SDPR</i>	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	2.74
NM_005252	<i>FOS</i>	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2.61
NM_001964	<i>EGR1</i>	early growth response 1	2.31
NM_007168	<i>ABCA8</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	2.27
NM_001964	<i>EGR1</i>	Early growth response 1	2.26
NM_002922	<i>RGS1</i>	regulator of G-protein signaling 1	2.22
NM_013363	<i>PCOLCE2</i>	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	2.20
NM_000115	<i>EDNRB</i>	endothelin receptor type B	2.08
NM_002922	<i>RGS1</i>	regulator of G-protein signaling 1	2.08
NM_017655	<i>GIPC2</i>	GIPC PDZ domain containing family, member 2	2.03
NM_001964	<i>EGR1</i>	early growth response 1	2.02
NM_030938	<i>TMEM49</i>	transmembrane protein 49	1.98
NM_001040092	<i>ENPP2</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	1.85
NM_001030287	<i>ATF3</i>	activating transcription factor 3	1.80
NM_004484	<i>GPC3</i>	glypican 3	1.74
NM_022068	<i>FAM38B</i>	family with sequence similarity 38, member B	1.74
NM_020530	<i>OSM</i>	oncostatin M	1.67
NM_016083	<i>CNR1</i>	cannabinoid receptor 1 (brain)	1.67
NM_004867	<i>ITM2A</i>	integral membrane protein 2A	1.65
NM_000963	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	1.56
NM_002089	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1.44
NM_002923	<i>RGS2</i>	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	1.43

Tabela 10. *Probes* diferencialmente expressos em comum nos testes SAM e RankProd. Foram selecionados os transcritos destacados em vermelho para a validação da expressão diferencial por PCR em tempo real.

Em seguida, a ferramenta computacional *ToppFun* do programa *ToppGene Suite* disponibilizado no site <http://toppgene.cchmc.org> foi utilizado para selecionarmos um subgrupo de genes candidatos baseados na análise funcional enriquecida da lista de genes. O *ToppGene* utiliza informações funcionais de genes do banco de dados do *Transcriptome* (expressão gênica), *Proteome* (domínios protéicos e interações), *Regulome* (TFBS, *transcription factor binding site*, e miRNA), *Ontologies* (*gene onthology*, vias de ativação), *Phenotype* (fenótipo de camundongo e doenças humanas), *Pharmacome* (associação fármaco-gene) e *Bibliome* (co-citações da literatura). A distribuição hipergeométrica com correção Bonferroni é utilizada como metodologia padrão para determinação de significância estatística dos resultados (Chen *et al.*, 2009).

A partir desta lista de *probes* em comum (**tabela 10**) na análise SAM e RankProd, observamos que vias de interesse baseadas em anotações funcionais foram as vias de resposta inflamatória, vias envolvidas na regulação da comunicação celular e genes associados ao neoplasma de câncer de mama (**tabela 11 e figura 15**).

Resposta Inflamatória		
Identificação gênica Entrez	Gene	Nome
5743	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
2920	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
5008	<i>OSM</i>	oncostatin M
2353	<i>FOS</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
1268	<i>CNR1</i>	cannabinoid receptor 1 (brain)
Regulação da comunicação celular		
Identificação gênica Entrez	Gene	Nome
2719	<i>GPC3</i>	glypican 3
5743	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
5008	<i>OSM</i>	oncostatin M
1268	<i>CNR1</i>	cannabinoid receptor 1 (brain)
1958	<i>EGR1</i>	early growth response 1
5997	<i>RGS2</i>	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
5996	<i>RGS1</i>	regulator of G-protein signaling 1
Resposta à vitamina D		
Identificação gênica Entrez	Gene	Nome
5743	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
Câncer de mama		
Identificação gênica Entrez	Gene	Nome
5743	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
2920	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
2353	<i>FOS</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
5997	<i>RGS2</i>	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa

Tabela 11. Vias enriquecidas nos quais os *probes* selecionados estão inseridos a partir de análise com a ferramenta *ToppGene* ($p < 0,05$).

Figura 15. Transcritos selecionados para validação envolvidos na resposta inflamatória e associados a câncer de mama de acordo com a ferramenta computacional *ToppGene*.

Os *probes* escolhidos para validação clusterizaram algumas amostras pareadas lado a lado (15, 35, 30) e houve uma tendência à separação correta (com exceção das amostras 16CAT, 27CAT, 34CAT e 43CAT) quanto ao perfil das amostras pré e pós-suplementação, como mostra o dendograma da **figura 16**.

Figura 16. *Heatmap* com dendograma dos *probes* selecionados para a validação por PCR em tempo real. Esses probes agruparam as amostras da seguinte maneira: pareadas (destacadas em verde), amostras pré-suplementação (destacadas em vermelho), e amostras pós-suplementação (destacadas em azul).

IV. 2. 5. 2. Efeito do calcitriol em amostras consideradas responsivas e não-responsivas

Grupo II: Somente amostras pré-suplementação com calcitriol

Nesta análise, utilizamos somente as amostras pré-suplementadas, totalizando 16 amostras (10 responsivas e 6 não-responsivas, **tabela 10**) a fim de verificar diferenças de expressão gênica entre as pacientes classificadas como responsivas das não-responsivas de acordo com a variação percentual de células positivas para o marcador de proliferação celular Ki-67.

Foram identificados 77 *probes* diferencialmente expressos, correspondendo a 38 genes conhecidos, utilizando-se o teste-t não-pareado e $p < 0,01$. Entretanto, esses *probes* não separaram as amostras de acordo com a resposta à suplementação: responsivas e não-responsivas (**Figura 18**).

Um dos principais processos biológicos nos quais esses transcritos estariam envolvidos é a organização e formação da junção celular, sendo *TNC* (tenascin C), *KRT5* (keratin 5) e *THBS1* (thrombostatin) os transcritos representados nessas vias. Dentre esses genes, foi feita a validação por PCR em tempo real do transcrito *THBS1*, hiperexpresso nas amostras consideradas não-responsivas pela metodologia de *microarray* (**figura 17**).

Figura 17. Expressão do gene *THBS1* no *microarray*. Amostras não-responsivas tendem a apresentar maior expressão deste transcrito.

Figura 18. Heatmap com dendrograma dos 77 probes diferencialmente expressos nas amostras de pacientes consideradas responsivas e não-responsivas. Os probes separaram as amostras responsivas das não-responsivas.

IV. 2. 6. Efeito da suplementação com calcitriol em genes selecionados diferencialmente expressos verificados por PCR em real time

Foram selecionados 10 genes diferencialmente expressos entre amostras pré e pós-suplementação no microarray para validação da expressão por PCR em tempo real. Para isto, foram analisadas as 16 amostras previamente utilizadas, constituindo um grupo de validação técnica. A seguir, foram também analisadas amostras pareadas provenientes de outras 4 pacientes (28, 31, 36 e 38), constituindo um grupo de validação biológica.

Foi verificada a correlação entre os dados gerados pelo *microarray* e pela PCR em tempo real. Os valores de intensidade de sinal normalizada por RMA do *microarray* e o valor da expressão relativa da PCR em tempo real foram transformados em escala logarítmica na base 2 para comparação. Houve correlação entre os dados dos transcritos *ATF3* (correlação de Pearson, $r=0,689$ e $p < 0,01$), *CXCL2* (correlação de Spearman, $r = 0,748$ e $p < 0,01$), *EGR1* (correlação de Spearman, $r = 0,664$ e $p < 0,01$), *FOS* (correlação de Pearson, $r=0,715$ e $p < 0,01$), *PTGS2* (correlação de Spearman, $r = 0,666$ e $p < 0,01$) e *RGS1* (correlação de Spearman, $r = 0,623$ e $p < 0,01$) (**Figura19**).

Figura 19. Correlação entre a expressão gênica gerada pelo *microarray* e PCR em tempo real. O nível de expressão dos transcritos *ATF3*, *CXCL2*, *EGR1*, *FOS*, *PTGS2* e *RGS1* foram verificados por PCR em tempo real mostrado no eixo X e houve correlação com o nível de intensidade no *microarray* apresentado no eixo Y. Todos os valores mostrados estão em $\log_2$.

A partir do grupo I (amostras pareadas em pré e pós-suplementação com vitamina D), foram selecionados sete genes hiperexpressos após a suplementação de calcitriol na análise de *microarray* (*ATF3*, *CXCL2*, *EGR1*, *FOS*, *FOSB*, *PTGS2*, *RGS1*), destacados na **tabela 11**. Além desses genes, também foi feita a validação dos transcritos *DUSP1*, *EGR2*, *G0S2* e *MMP12*, diferencialmente expressos nas análises SAM e Rank Prod separadamente. Esses transcritos foram selecionados por haver uma possível interação com os demais quanto a resposta inflamatória e remodelamento da matriz extracelular (Camargo *et al.*, 2010 e Cho *et al.*, 2006). O valor da média de expressão das amostras pré-suplementação de cada transcrito foi utilizado como referência, assim a expressão absoluta foi normalizada pela expressão do gene housekeeping *GAPDH* e em seguida a expressão relativa foi calculada em comparação com a média da expressão absoluta das amostras pré-suplementação. Os valores de expressão foram transformados em $\log_2$ (expressão relativa) para análise pelos testes estatísticos empregados.

A **figura 20** mostra a expressão relativa dos transcritos selecionados para validação por PCR em tempo real. Houve diferença estatística entre a amostra pré a pós-suplementação na expressão dos transcritos *DUSP1*, *EGR1*, *FOS*, *MMP12* e *RGS1* ($p < 0,05$).

Figura 20. Expressão relativa dos transcritos selecionados por PCR em tempo real. *Boxplot* representa a distribuição de todos os valores entre as barras (quartile 25, 50 e 75 na caixa) exceto *outliers*. O *boxplot* da esquerda representa as amostras pré-suplementação (n = 20) e o *boxplot* da direita representa as amostras após suplementação (n = 20). Os gráficos contendo *boxplots* azuis, não apresentaram diferença estatística significativa na comparação da expressssão pré e pós-suplementação e os vermelhos apresentaram um valor de $p < 0,05$.

A expressão de *FOSB* não foi confirmada como diferencialmente expresso pela metodologia de PCR em tempo real, ao contrário do resultado esperado do *microarray*, no qual a expressão do mesmo encontrou-se aumentada (**figura 21**). O sinal de amplificação após PCR em tempo real foi obtida somente com um *Ct* (*cycle threshold*), elevado (após ciclo 28), o que prejudica a análise, sendo então excluída esta determinação.

Figura 21. Expressão do transcrito *FOSB* após a normalização da intensidade de sinal do *microarray*. Apesar deste gene ser hiper-regulado após a suplementação com vitamina D e apresentar um *fold* (expressão pós/expressão pré) alto (2,95) no *microarray*, não pode ser validado por PCR em tempo real. Marcação em vermelho correspondem às amostra pré-suplementação e azul, às amostras pós-suplementação

Adicionalmente foi verificada a expressão do transcrito *THBS1*, que se apresentou diferencialmente expresso no grupo II (amostras pré-suplementadas classificadas como responsivas ou não-responsivas ao calcitriol) pela análise de *microarray*. A expressão deste transcrito também não foi uniforme e não caracterizou nenhum dos dois grupos analisados quanto a responsividade a vitamina D, como mostra a **figura 22** e não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo responsivo e o não responsivo.

Figura 22. Expressão do gene *THBS1*, selecionado para validação por PCR em tempo real. Todas as amostras foram normalizadas com a expressão do transcrito *GAPDH*.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Estudos evidenciam a importância da vitamina D na patogênese e na progressão do câncer de mama e níveis baixos de vitamina D foram observados em mulheres com câncer e em pacientes que apresentam pior prognóstico da doença (Lyra *et al.*, 2006; Goodwin *et al.*, 2008).

Os efeitos antiproliferativos da vitamina D são mediados pelo receptor intracelular VDR (receptor de vitamina D), membro da família de receptores esteróidicos, estrogênicos e retinóide. O complexo VDR/ligante se associa à elementos responsivos de vitamina D (VDREs) nucleares de diversos genes, modulando a proliferação e diferenciação celular e indução de apoptose em células tumorais (Colston & Hansen, 2002; Christakos *et al.*, 2003; Ondková *et al.*, 2006; Fedirko *et al.*, 2009). Em nosso estudo, todas as amostras expressavam VDR, independentemente da suplementação com calcitriol.

Linhagens celulares de câncer de mama expostas a doses farmacológicas de calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 100nM) sofrem influência da vitamina D, com redução da proliferação e alteração da expressão gênica, entretanto até o momento não se conhece o efeito transcricional de concentrações fisiológicas de calcitriol em amostras de câncer de mama.

A suplementação com vitamina D é indicada a mulheres pós-menopausadas para prevenção de osteoporose (Mitchner e Harris, 2009) e dados de nosso grupo indicam que a suplementação de calcitriol também pode levar a uma redução da proliferação do câncer de mama (Lyra, tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2008). Outro estudo indica que a vitamina D em doses altas (DN101, 45µg uma vez por semana) associada ao naproxen (375mg, duas vezes ao dia) pode trazer benefícios ao paciente com

câncer de próstata reduzindo a progressão da doença (Srinivas e Feldman, 2009).

No presente trabalho, avaliamos inicialmente as diferenças no perfil de expressão das amostras pré e pós-suplementação de calcitriol no intuito de avaliar o efeito da vitamina D. Como a análise dos dados gerados pelo *microarray* é diversa, não havendo uma maneira “correta” de fazê-la, resolvemos aplicar dois testes estatísticos: SAM (*Significant Analysis of Microarrays*) e RankProd, ambos pareados (amostras pré- x amostras pós-suplementação).

A técnica estatística SAM é a metodologia para análise de dados de *microarray* mais utilizada. SAM é um teste-t modificado não-paramétrico que atribui valores para cada gene baseado na diferença de expressão gênica relativa ao desvio padrão de permutações repetidas (Smyth *et al.*, 2002).

Outro teste estatístico não-paramétrico baseado em permutações utilizado foi o RankProd, que “ranqueia” os genes hiper e hipoexpressos em listas de acordo com as diferentes condições experimentais. Quanto menor o valor RP (“rankprod”), menor a probabilidade que a colocação do gene observado estar ranqueado no topo da lista seja atribuída aleatoriamente. Esse teste estatístico é indicado para amostras heterogêneas e não é necessária uma normalização simultânea de dados múltiplos. Essa análise também pode ser empregada em estudos de proteômica e metabolômica (Hong *et al.*, 2006).

Ambas as análises associam taxas de genes falso-positivos (FDR, *false discovery rate*). A análise estatística SAM, por ser um teste-t variado, baseia-se na variância da expressão de cada gene antes e após a suplementação com calcitriol, entretanto como o perfil gênico de uma mesma paciente é mais

homogêneo antes e após a suplementação, não havendo grandes alterações, variações entre as pacientes poderiam ser eliminadas na análise. Portanto, optamos em utilizar também a análise pelo RankProd, que considera amostras heterogêneas e é muito indicada para estudo de doenças complexas, em que há o envolvimento de vários genes que não necessariamente estão sendo expressos uniformemente em todas as amostras.

As análises estatísticas SAM e RankProd foram feitas separadamente e em seguida avaliamos os genes diferencialmente expressos em comum, resultando em 24 *probes* hiperexpressos (correspondendo a 21 genes). Os genes modulados estavam nas vias de resposta inflamatória, regulação da comunicação celular ou associados ao neoplasma de mama.

Em seguida foi feita a clusterização hierárquica das amostras antes e após a suplementação de acordo com *probes* diferencialmente expressos em ambas as análises feitas (SAM e RankProd). A clusterização desses *probes* não resultou na separação das amostras pré e pós-suplementação e muitas amostras foram agrupadas lado-a-lado com o respectivo par. Esta observação pode ser atribuída à similaridade na expressão gênica de amostras provenientes da mesma paciente. Resultado semelhante foi obtido por outros autores em análise de amostras tumorais obtidas antes e após quimioterapia neoadjuvante, indicando que mesmo fármacos citotóxicos usados por um período de tempo maior, não causam alteração no perfil transcricional global, que permita agrupamento diferencial (Perou *et al.*, 2000; Folgueira *et al.*, 2009).

Para a validação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real, foram selecionados sete genes hiperexpressos em amostras pós-suplementação de calcitriol. Esses transcritos foram selecionados por haver

uma possível interação com os demais em relação às funções consideradas moduladas, isto é, resposta inflamatória e remodelamento da matriz extracelular (Camargo *et al.*, 2010 e Cho *et al.*, 2006).

Houve correlação entre os dados gerados pelo *microarray* e a PCR em tempo real na expressão dos transcritos *ATF3*, *CXCL2*, *EGR1*, *FOS*, *PTGS2* e *RGS1*. Além disso, dados de expressão gênica obtidos por PCR, confirmam o efeito do calcitriol induzindo a expressão dos transcritos *DUSP1*, *EGR1*, *FOS*, *MMP12* e *RGS1*.

Analisando os genes modulados pelo calcitriol, observamos aumento de expressão de *FOS*. Esta proteína, juntamente com JUN, forma o complexo do fator de transcrição AP-1, o qual desempenha um papel central no controle de diversos processos celulares como proliferação celular, diferenciação, apoptose e transformação. A função oncogênica de Fos é conhecida, entretanto, um número crescente de autores relatam uma função supressora-tumoral em diversos tipos de câncer (Durchdewald *et al.*, 2009). No modelo de adenocarcinoma mamário em camundongos, a expressão de c-Fos foi detectada em células pouco invasivas e não metastáticas, mas não foi encontrada nas células altamente metastáticas (Kustikova *et al.*, 1998). Já em amostras de câncer de mama humanos, a proteína e mRNA de *FosB* foram detectados em células normais do epitélio e em tumores bem diferenciados (tipos 1 e 2) e sua expressão apresentou-se diminuída em células pouco diferenciadas (Milde-Langosch *et al.*, 2003).

A expressão do gene *FOS* é modulada pela vitamina D por possuir em sua região promotora um elemento responsivo à vitamina D (VDRE). Por sua vez, genes que possuem sítio de ligação para AP-1, como *ATF3* (fator de

transcrição de ativação 3) e *MMP12* (metaloproteinases de matriz), são regulados por FOS e em nosso estudo, a expressão em ambos foi aumentada após a suplementação com calcitriol.

Matriz metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases que clivam proteínas da matriz extracelular. MMPs podem regular o microambiente tumoral, atuando no crescimento, diferenciação, apoptose, migração e invasão tumoral, e sua expressão encontra-se aumentada na maioria dos tumores, comparados ao tecido normal. Ao contrário dos oncogenes clássicos, MMPs não se encontram hiperexpressas por amplificação gênica ou por ativação devido a mutação. O aumento na expressão de MMPs em tumores provavelmente é conseqüente a mudanças transcricionais (Egeblad e Werb, 2002). São mais de 21 tipos de MMPs e muitos possuem sítio de ligação para o fator de transcrição AP-1, como os genes *MMP1*, *MMP3* e *MMP12* (Benbow e Brinkerhoff, 1997 e Wu *et al.*, 2001).

Ao contrário das demais MMPs que apresentam uma associação negativa em relação ao prognóstico do câncer, a expressão de *MMP12* em células tumorais de cólon está associada à um aumento na sobrevida e a uma diminuição da neovascularização tumoral (Yang *et al.*, 2001). Isso ocorre devido à produção de angiostatina e endostatina após a clivagem do plasminogênio e do colágeno XVIII pela *MMP12*, levando a um efeito angioestático (Gorrin-Rivas *et al.*, 2000).

Além do transcrito *MMP12*, os transcritos *MMP1*, *MMP3* e *MMP13* apresentaram-se diferencialmente expressos na análise feita pelo RankProd, mostrando-se hipoexpressos em amostras pós-suplementação de calcitriol. A expressão de *MMP1* (colagenase-1) encontra-se aumentada em células

tumorais e a mesma foi associada à invasão local de células de câncer de mama e à presença de comprometimento linfonodal (Przybylowska *et al.*, 2006). Já a hiperexpressão de *MMP3* na glândula mamária está associada à iniciação do câncer de mama em camundongos (Sternlicht *et al.*, 1999 e Ho *et al.*, 2001). Ho *et al.* (2010) relataram que em monócitos, a supressão de *MMP1* e *MMP3* via IFN- γ é induzida pelo fator de transcrição de ativação do repressor transcricional ATF3. Em nosso estudo, há uma tendência a um aumento de expressão do transcrito *ATF3*, assim é possível que a vitamina D através da regulação deste transcrito, esteja modulando a expressão de *MMP1* e *MMP3*, reduzindo o potencial de invasão do tumor.

Além desses transcritos, um gene candidato a supressor tumoral, *early growth response gene 1* (*EGR1*) encontrou-se também hiperexpresso em nossa análise. A expressão do gene *EGR1* difere em cada tipo de carcinoma. Níveis diminuídos desta proteína ou de seu mRNA estão associados a um pior prognóstico em tumores de mama (Huang *et al.*, 1997), pulmão (Levin *et al.*, 1995), pele, fígado e esôfago (Hao *et al.*, 2002). Em contrapartida, em carcinomas de próstata, estômago e colo-retal a expressão deste gene foi aumentada (Eid *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2002; Tsunoda *et al.*, 2003). Relata-se também que em espécimes de câncer de mama que não possuíam receptor de estrógeno (ER negativos) o gene *EGR1*, (detectado por FISH, *fluorescence in situ hybridization*) estava deletado, ao contrário das amostras de câncer de mama ER positivas. Sugere-se portanto, a importância deste gene para a patogênese de carcinomas mamários ER negativos (Ronski *et al.*, 2005). Não verificamos essa associação entre os níveis de expressão do transcrito *EGR1* por PCR em tempo real e a ausência de receptor de estrógeno

no grupo de amostras tratadas com calcitriol. No trabalho de Ronski *et al.* (2005), a deleção de *EGR1* foi atribuída à célula contada se a razão entre o número de centrômeros e a marcação da sonda para *EGR1* que a mesma possuía fosse maior do que 1. Em tumores, a poliploidia é freqüente e essa deleção é relativa, uma vez que foram encontrados em algumas amostras um maior número de sinais para o centrômero do cromossomo 5 do que para a sonda de *EGR1*. Como a metodologia de PCR em tempo real não analisa as células individualmente, deleções relativas podem ter sido mal-interpretadas e por isso não foi observada uma associação entre amostras ER negativos e deleção de *EGR1*.

Corroborando nossos dados, demonstrou-se que em células HL60, provenientes de leucemia, tratadas com vitamina D (1,25(OH)₂D₃, calcitriol) há uma diminuição na proliferação celular por indução de *EGR1* de maneira dose-dependente, posteriormente contribuindo para a expressão de p35. O aumento de expressão de p35 levou à fosforilação de Cdk5, inativação de MEK1, componente da via de sinalização Ras/Raf/KEK/Erk e consequentemente a uma redução na proliferação nas células tratadas com calcitriol (Chen *et al.*, 2004). Dentre esses genes citados no mecanismo de regulação de proliferação mediante o tratamento de vitamina D, neste trabalho somente a expressão aumentada de *EGR1* foi verificada e não a ativação desta via, entretanto este gene parece estar *upstream* do gene *ATF3*, também encontrado hiperexpresso no microarray, uma vez que a overexpressão de *EGR1* induz *ATF3* (Fu *et al.*, 2003).

Outro gene também hiperexpresso em nossas análises foi o *DUSP1* (*dual specificity phosphatase 1*). Ele pertence ao subgrupo de genes altamente

indutíveis que são rapidamente regulados positivamente em resposta ao estresse e/ou estímulo mitogênico à nível transcricional (*DUSP1/MKP-1*, *DUSP2/PAC-1*, *DUSP4/MKP-2* e *DUSP5/hVH3*). Codificam proteínas nucleares que inativam ERK, JNK e p38 MAPK, regulando negativamente a proliferação celular (Patterson *et al.*, 2009). *DUSP1/MKP-1* é importante na modulação da biosíntese de citocinas em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias, além de participar na resposta anti-inflamatória a glucocorticóides (Chi *et al.*, 2006 e Hammer *et al.*, 2006). *DUSP1* também atua na regulação de mais de uma MAPK (Wu *et al.*, 2006) e sua indução conseqüente à ação de glucocorticóides, resulta na desfosforilação e inativação da proteína p38-MAPK e inibição da via de ERK, interrompendo a sinalização na resposta inflamatória pulmonar (Newton *et al.*, 2010).

Além de *DUSP1*, a expressão aumentada de *RGS1* (*regulator of G-protein signaling 1*) após a suplementação de calcitriol no microarray também foi confirmada na PCR em tempo real. O *RGS1* participa na regulação da sinalização da proteína G. A proteína G é constituída de duas subunidades: α (ligada ao GDP) e $\beta\gamma$. Na presença do ligante, há uma mudança conformacional de seu receptor que ativa a proteína G, dissociando essas duas subunidades, estando a subunidade α ligada ao GTP. São essas subunidades que interagem com diversas moléculas efetoras, mediando respostas celulares como proliferação e migração. A via é desativada quando a subunidade α hidroliza o GTP a GDP (Hurst e Hook, 2009). Proteínas RGS aceleraram a atividade da GTPase da subunidade α em até 1000 vezes (Posner *et al.*, 1999), inibindo a sinalização induzida por ligantes de receptores acoplados à proteína G. Descreve-se que o *RGS1* é induzido pela privação de ferro e pela vitamina

D na diferenciação de células da leucemia mielóide aguda (Callens *et al.*, 2010). Este gene mostrou-se upregulado também após tratamento por duas semanas com inibidores de aromatase (letrozol e anastrozol) de pacientes com câncer de mama ER positivas. Neste trabalho observou-se uma significativa redução na expressão do antígeno Ki-67 (em mais de 90% das pacientes) após o tratamento (Mackay *et al.*, 2007), bem como maior expressão dos genes *RGS1* e *DUSP1*.

Foi atribuída ao calcitriol uma significativa ação anti-inflamatória em câncer de próstata (Krishnan *et al.*, 2003), além de diminuir a expressão de COX-2 e aumentar a de *15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase* (15-PGDH), reduzindo os níveis e a atividade de prostaglandinas. O calcitriol também inibe a expressão da aromatase nas células do câncer de mama e de células do tecido adiposo adjacente por repressão direta da transcrição da aromatase e indiretamente ao reduzir níveis da prostaglandina E₂ (Krishnan *et al.*, 2010).

Como as vias de sinalização que parecem ser moduladas pela suplementação com vitamina D comum em todas as análises envolvem processos inflamatórios, é provável que em nosso estudo esta atividade anti-inflamatória do calcitriol module a expressão dos genes candidatos validados pela PCR quantitativa em tempo real.

Também foram analisadas somente os *arrays* das amostras provenientes da biópsia a fim de verificarmos se havia alguma diferença no perfil de expressão entre o grupo de pacientes classificadas com responsivas e não-responsivas. Os 38 genes diferencialmente expressos clusterizaram as amostras em dois grupos, responsivo e não-responsivo e um dos principais

processos biológicos nos quais esses transcritos estariam envolvidos são a organização e formação da junção celular.

Nossos dados indicam que a suplementação de calcitriol, apesar de realizada por um curto período, pode reduzir a proliferação do câncer de mama em mulheres pós-menopausadas e modular a expressão de vários genes envolvidos no crescimento e controle do ciclo celular como a proteína quinase (MAPK) e em processos inflamatórios. Em pacientes que sofrem de asma, doses mais elevadas de vitamina D sérica ($25(\text{OH})\text{D} > 30\text{ng/mL}$) foram associadas a um aumento de função pulmonar e menor expressão de $\text{TNF-}\alpha$, uma citocina pró-inflamatória, nas células mononucleares séricas (Sutherland *et al.*, 2010). Relata-se também que níveis crescentes de vitamina D estão associados com a redução da necessidade de terapia com anti-inflamatórios (Brehm *et al.*, 2009).

Alguns estudos relataram a ação da vitamina D no perfil de expressão gênica de linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 (Costa *et al.*, 2009), MCF10A (Lee *et al.*, 2006) e MDA-MB-231 (Swami *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* são importantes modelos na identificação de vias reguladas pelo calcitriol, entretanto além de utilizarem doses supra-fisiológicas, não passíveis de administração *in vivo*, não consideram as interações com o microrambiente tumoral. Nosso estudo é inédito, pois avalia o perfil transcricional de amostras de câncer de mama de pacientes que realizaram suplementação de calcitriol.

Nossos dados indicam que a suplementação de calcitriol reduz a atividade proliferativa tumoral e regula a expressão de genes como *DUSP1*, *EGR1*, *RGS1*, *MMP12* e *FOS*, envolvidos na sinalização intracelular de várias vias. Além disso, nossos resultados abrem perspectivas para estudos

complementares a fim de investigar uma potencial ação quimiopreventiva da suplementação de vitamina D em mulheres pós menopausadas.

CONCLUSÃO

VI. Conclusão

1. O calcitriol reduz o índice de proliferação tumoral em metade das pacientes que realizaram suplementação;
2. A suplementação de calcitriol influencia o perfil transcricional, contudo o agrupamento pareado das amostras na clusterização hierárquica indica que a similaridade entre as amostras se mantém como fator preponderante;
3. O calcitriol induz a expressão dos genes *EGR1*, *RGS1*, *MMP12*, *DUSP1* e *FOS*;
4. Foram identificados 38 genes diferencialmente expressos entre as amostras responsivas e não-responsivas. A expressão destes genes não clusterizou os grupos corretamente.

ANEXOS

Anexo I. *Probes* diferencialmente expressos (48 probes) após suplementação de calcitriol pela metodologia de SAM (Significant Analysis of Microarrays). *Probes* destacados em amarelo apresentaram expressão diferenciada no teste RankProd. Os probes destacados em amarelo e em rosa foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

REFSEQ	Gene	Nome do gene	Fold change (Pós/Pré)
NM_006732	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	2.95
NM_005746	PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	2.94
NM_004657	SDPR	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	2.74
NM_005252	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2.61
NM_001964	EGR1	early growth response 1	2.31
NM_007168	ABCA8	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	2.27
NM_001964	EGR1	Early growth response 1	2.26
NM_002922	RGS1	regulator of G-protein signaling 1	2.22
NM_013363	PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	2.20
NM_000115	EDNRB	endothelin receptor type B	2.08
NM_002922	RGS1	regulator of G-protein signaling 1	2.08
NM_017655	GIPC2	GIPC PDZ domain containing family, member 2	2.03
NM_001964	EGR1	early growth response 1	2.02
NM_030938	TMEM49	transmembrane protein 49	1.98
NM_001001851	ITIH5	inter-alpha (globulin) inhibitor H5	1.89
NM_001040092	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	1.85
NM_000399	EGR2	early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	1.83
NM_001030287	ATF3	activating transcription factor 3	1.80
NM_006210	PEG3	paternally expressed 3	1.79
NM_001063	TF	transferrin	1.78
NM_004484	GPC3	glypican 3	1.74
NM_022068	FAM38B	family with sequence similarity 38, member B	1.74
NM_003739	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	1.72
NM_006210	PEG3	paternally expressed 3	1.72
NM_000227	LAMA3	laminin, alpha 3	1.70
NM_020530	OSM	oncostatin M	1.67
NM_016083	CNR1	cannabinoid receptor 1 (brain)	1.67
NM_005596	NFIB	nuclear factor I/B	1.66

NA	NA	Transcribed locus	1.66
NM_004867	<i>ITM2A</i>	integral membrane protein 2A	1.65
NM_016619	<i>PLAC8</i>	placenta-specific 8	1.64
NM_001001971	<i>FAM13C1</i>	family with sequence similarity 13, member C1	1.63
NA	NA	NA	1.59
NM_004867	<i>ITM2A</i>	integral membrane protein 2A	1.59
NM_000963	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	1.56
NM_014243	<i>ADAMTS3</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 3	1.53
NM_213599	<i>TMEM16E</i>	transmembrane protein 16E	1.47
NM_002089	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1.44
NM_002923	<i>RGS2</i>	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	1.43
NM_006210	<i>PEG3</i>	Paternally expressed 3	1.41
NM_002716	<i>PPP2R1B</i>	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, beta isoform	1.39
NA	NA	Transcribed locus	1.38
NM_000891	<i>KCNJ2</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	1.36
NM_003966	<i>SEMA5A</i>	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	1.35
NM_015277	<i>NEDD4L</i>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	1.29
NM_001015045	<i>FAM13A1</i>	family with sequence similarity 13, member A1	1.27
NM_001015045	<i>FAM13A1</i>	family with sequence similarity 13, member A1	1.27
NA	NA	Transcribed locus	1.22

Anexo IIa. Probes hiperexpressos (81 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd. Os probes destacados em amarelo (em comum com a análise SAM) e em rosa foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

REFSEQ	Gene	Nome do geneE	p-Values
NM_005252	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0
NM_005746	PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	0
NM_002922	RGS1	regulator of G-protein signaling 1	0
NM_002922	RGS1	regulator of G-protein signaling 1	0
NM_004417	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	2.44E-07
NM_000900	MGP	matrix Gla protein	3.66E-07
NM_004797	ADIPOQ	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	4.88E-07
NM_002089	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	4.88E-07
NM_006732	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	4.88E-07
NA	NA	Transcribed locus	4.88E-07
NM_013363	PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	4.88E-07
NM_001030287///NM_001040619///NM_001674///NM_004024	ATF3	activating transcription factor 3	8.54E-07
NM_002426	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	1.71E-06
NM_001442	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	2.07E-06
NM_002644	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor	2.44E-06
NM_000963	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2.44E-06
NM_007168	ABCA8	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	3.54E-06
NM_001964	EGR1	Early growth response 1	3.54E-06
NM_002923	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	3.54E-06
NM_001964	EGR1	early growth response 1	4.15E-06
NA	NA	Transcribed locus	5.24E-06
NM_000668///NM_000669	ADH1B///ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide///alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	8.05E-06
NM_001964	EGR1	early growth response 1	9.39E-06
NM_007191	WIF1	WNT inhibitory factor 1	9.88E-06
NM_000111	SLC26A3	solute carrier family 26, member 3	1.32E-05
NM_000072///NM_001001547///NM_01001548	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	1.71E-05

Anexo IIa (cont). *Probes* hiperexpressos (81 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd. *Probes* destacados foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

NA	NA	NA	1.82E-05
NM_000668///NM_000669		alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide///alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	
	<i>ADH1B///ADH1C</i>		2.52E-05
NM_003012	<i>SFRP1</i>	secreted frizzled-related protein 1	3.02E-05
NM_000860	<i>HPGD</i>	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	3.35E-05
NM_003518	<i>HIST1H2BG</i>	histone cluster 1, H2bg	3.49E-05
NM_006186///NM_173171///NM_173172///NM_173173	<i>NR4A2</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	4.51E-05
NM_004867	<i>ITM2A</i>	integral membrane protein 2A	4.77E-05
NM_000072///NM_001001547///NM_01001548	<i>CD36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	5.40E-05
NM_015429	<i>ABI3BP</i>	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein	5.67E-05
NM_003251	<i>THRSP</i>	thyroid hormone responsive (SPOT14 homolog, rat)	5.68E-05
NM_145234	<i>CHRD1</i>	chordin-like 1	5.76E-05
NM_000860	<i>HPGD</i>	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	6.04E-05
NM_030938	<i>TMEM49</i>	transmembrane protein 49	6.84E-05
NA	NA	Transcribed locus	7.16E-05
XM_067585///XM_940071	<i>COL6A6</i>	collagen type VI alpha 6	7.35E-05
NM_004430///XM_001130047	<i>EGR3</i>	early growth response 3	7.45E-05
NA	NA	NA	7.65E-05
NA	NA	Homo sapiens, clone IMAGE:4696935, mRNA	8.51E-05
NM_002614///XM_001126677///XM_01126710///XM_001126720	<i>PDZK1</i>	PDZ domain containing 1	8.55E-05
NM_001040092///NM_006209	<i>ENPP2</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	8.90E-05
NM_014057///NM_024416///NM_033014	<i>OGN</i>	osteoglycin	9.35E-05
NM_004657	<i>SDPR</i>	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	1.02E-04
NM_006186///NM_173171///NM_173172///NM_173173	<i>NR4A2</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1.23E-04
NM_001723///NM_015548///NM_020388///NM_183380///XM_001132795	<i>DST</i>	dystonin	1.39E-04

Anexo IIa (cont). *Probes* hiperexpressos (81 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd. *Probes* destacados foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

NM_000587	C7	complement component 7	1.42E-04
NM_006186///NM_173171///NM_173172///NM_173173	NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1.50E-04
NM_001040002///NM_004527///NM_013999	MEOX1	mesenchyme homeobox 1	1.52E-04
NM_000115///NM_003991	EDNRB	endothelin receptor type B	1.62E-04
NM_001040152///NM_015068	PEG10	paternally expressed 10	1.63E-04
NM_002443///NM_138634	MSMB	microseminoprotein, beta-	1.65E-04
NM_006418	OLFM4	olfactomedin 4	1.67E-04
XM_378973///XM_944897	LOC284801	hypothetical protein LOC284801	1.84E-04
NM_003012	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	2.03E-04
NM_006931	SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	2.09E-04
NM_021052	HIST1H2AE	histone cluster 1, H2ae	2.12E-04
NM_001554	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2.33E-04
NM_014289	CAPN6	calpain 6	2.68E-04
NM_002852	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	2.69E-04
NM_015714	G0S2	G0/G1switch 2	2.82E-04
NM_004525	LRP2	low density lipoprotein-related protein 2	2.96E-04
NM_001124	ADM	adrenomedullin	3.05E-04
NA	NA	Transcribed locus	3.44E-04
NM_016083///NM_033181	CNR1	cannabinoid receptor 1 (brain)	3.58E-04
NM_004951	EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	3.78E-04
NM_003012	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	3.80E-04
NM_020530	OSM	oncostatin M	3.96E-04
NM_005794///NM_182908	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	4.17E-04
NM_017655	GIPC2	GIPC PDZ domain containing family, member 2	4.41E-04
NM_004484	GPC3	glypican 3	4.43E-04
NM_006274	CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19	4.49E-04
NM_000072///NM_001001547///NM_01001548	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	4.65E-04
XM_380146///XM_930545///XM_935361///XM_935362///XM_935363///XM_935364	FLJ43663	hypothetical protein FLJ43663	4.72E-04

Anexo IIa (cont). *Probes* hiperexpressos (81 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd. *Probes* destacados foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

935364///XM_935365///XM_935366/// XM_935367///XM_935688///XM_9359 57///XM_935958///XM_935959///XM_ 935960///XM_935961///XM_935962/// XM_935963///XM_935964///XM_9405 26///XM_944629///XM_944633///XM_ 944638///XM_944640///XM_944641/// XM_944643///XM_944645///XM_9446 47			
NM_022068	<i>FAM38B</i>	family with sequence similarity 38, member B	4.74E-04
NM_145650	<i>MUC15</i>	mucin 15, cell surface associated	4.74E-04
NM_032229	<i>SLITRK6</i>	SLIT and NTRK-like family, member 6	4.83E-04

Anexo IIb. Probes hipoexpressos (51 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd.

REFSEQ	Gene	Nome do gene	p-Values
NM_002421	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0
NM_000526	KRT14	keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)	1.65E-04
NM_152997	C4orf7	chromosome 4 open reading frame 7	8.05E-06
NM_004950	EPYC	epiphygan	0
NM_000517	HBA2	hemoglobin, alpha 2	0
NM_000518	HBB	hemoglobin, beta	0
NM_001854///N M_080629///NM _080630	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	0
NM_002422	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	2.07E-06
NM_000518	HBB	hemoglobin, beta	0
NM_000518	HBB	hemoglobin, beta	1.22E-07
NM_005141	FGB	fibrinogen beta chain	9.61E-05
NM_000558	HBA1	hemoglobin, alpha 1	2.44E-07
NM_002381	MATN3	matrilin 3	4.01E-05
NM_001843///N M_175038	CNTN1	Contactin 1	1.71E-06
NM_006181	NTN2L	Netrin 2-like (chicken)	2.49E-04
NM_001719	BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	4.23E-05
NM_002483	CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	2.59E-04
NM_005014	OMD	osteomodulin	2.12E-05
NM_001843///N M_175038	CNTN1	Contactin 1	2.44E-07
NM_000517///N M_000558	HBA1///HBA2	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2	4.88E-07
NM_002427	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	4.88E-07
NM_000517///N M_000558	HBA1///HBA2	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2	6.10E-07
NM_001854///N M_080629///NM _080630	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	2.44E-07

Anexo IIb (cont). *Probes* hiporexpressos (51 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd.

NM_017680	ASPN	asporin	7.32E-07
NA	IGL@///IGLV1-44	Immunoglobulin anti-HBsAg lambda light chain (LM25)///Immunoglobulin lambda locus///Immunoglobulin lambda variable 1-44	1.26E-04
NM_004004	GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa	2.52E-05
NA	NA	CDNA FLJ41270 fis, clone BRAMY2036387	3.16E-05
NM_000493	COL10A1	collagen, type X, alpha 1(Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	3.15E-05
NM_015444	TMEM158	transmembrane protein 158	2.79E-04
NM_001854///N M_080629///NM _080630	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	6.10E-07
NM_003725	HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)	3.93E-05
NM_173808	NEGR1	neuronal growth regulator 1	2.68E-05
NM_000517///N M_000558	HBA1///HBA2	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2	1.71E-06
NM_000517///N M_000558	HBA1///HBA2	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2	1.46E-06
NM_006350///N M_013409	FST	follicle-stimulating hormone receptor	7.19E-06
NM_003725	HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)	4.40E-05
NM_003480	MFAP5	microfibrillar associated protein 5	2.52E-05
NM_006587	CORIN	corin, serine peptidase	8.66E-06
NA	NA	CDNA FLJ35259 fis, clone PROST2004251	1.16E-05
NM_018689	KIAA1199	KIAA1199	1.22E-04
NM_017680	ASPN	asporin	2.59E-04
NM_000493	COL10A1	collagen, type X, alpha 1(Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	2.52E-05
NM_030945///N M_181435	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	2.84E-04
NM_000184///N M_000559	HBG1///HBG2	hemoglobin, gamma A///hemoglobin, gamma G	2.24E-05
NM_130830	LRRC15	leucine rich repeat containing 15	1.91E-04
NM_000793///N M_001007023///			
NM_013989	DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II	1.16E-05
NM_006587	CORIN	corin, serine peptidase	5.24E-05

Anexo IIb (cont). *Probes* hiporexpressos (51 probes) após suplementação de calcitriol após análise feita pelo RankProd.

NM_001034061/ //NM_018941	CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)	7.63E-05
NM_003325	HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	9.79E-05
NM_000793///N M_001007023///			
NM_013989	DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II	2.94E-04
NA	NA	Transcribed locus, weakly similar to XP_525597.1 similar to neuronal pentraxin receptor isoform 2 [Pan troglodytes]	9.10E-05

Anexo III. *Probes* diferencialmente expressos nas amostras não-responsivas em relação às amostras responsivas antes da suplementação de calcitriol pela análise Teste-t não-pareado. Os probes destacados em amarelo foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

PROBE_ID	Gene	Nome do gene	Adj p value	Expressão (Não-resposta – Resposta)
223423_at	GPR160	G protein-coupled receptor 160	2,50E-04	up
215532_x_at	ZNF492	zinc finger protein 492	2,50E-04	up
239580_at	NA	CDNA clone IMAGE:5302158	3,75E-04	down
226755_at	LOC642587	NPC-A-5	7,49E-04	down
200884_at	CKB	creatine kinase, brain	8,74E-04	up
224505_s_at	PLCD4	phospholipase C, delta 4	8,74E-04	up
205347_s_at	TMSL8	thymosin-like 8	8,74E-04	up
241456_at	NA	CDNA FLJ30785 fis, clone FEBRA2000901	9,99E-04	down
201645_at	TNC	tenascin C (hexabrachion)	0,001123876	down
217551_at	LOC441453	similar to olfactory receptor, family 7, subfamily A, member 17	0,001373626	up
1558508_a_at	C1orf53	chromosome 1 open reading frame 53	0,001498502	up
219797_at	MGAT4A	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A	0,001498502	up
230497_at	BRUNOL5	bruno-like 5, RNA binding protein (Drosophila)	0,001873127	down
229292_at	EPB41L5	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5	0,001998002	down
201369_s_at	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	0,001998002	up
229796_at	SIX4	SIX homeobox 4	0,002122877	up
243929_at	NA	Transcribed locus	0,002247752	down
223500_at	CPLX1	complexin 1	0,002372627	down
226301_at	C6orf192	chromosome 6 open reading frame 192	0,002497503	down
222529_at	SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	0,002622378	down
232304_at	PELI1	Pellino homolog 1 (Drosophila)	0,002872128	down
243997_x_at	NA	Transcribed locus	0,002997003	up
204485_s_at	TOM1L1	target of myb1 (chicken)-like 1	0,002997003	down
226123_at	CHD7	chromodomain helicase DNA binding protein 7	0,003121878	down
227904_at	AZI2	5-azacytidine induced 2	0,003371629	up
219294_at	CENPQ	centromere protein Q	0,003371629	up

Anexo III (cont.). *Probes* diferencialmente expressos nas amostras não-responsivas em relação às amostras responsivas antes da suplementação de calcitriol pela análise Teste-t não-pareado. Os probes destacados em amarelo foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

219696_at	<i>C1orf218</i>	chromosome 1 open reading frame 218	0,003621379	up
39248_at	<i>AQP3</i>	aquaporin 3 (Gill blood group)	0,003746254	down
219990_at	<i>E2F8</i>	E2F transcription factor 8	0,003746254	up
221942_s_at	<i>GUCY1A3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	0,004120879	down
230661_at	<i>LOC286191</i>	Hypothetical protein LOC286191	0,004120879	down
201403_s_at	<i>MGST3</i>	microsomal glutathione S-transferase 3	0,004120879	down
235210_s_at	<i>RPESP</i>	RPE-spondin	0,004120879	up
219181_at	<i>LIPG</i>	lipase, endothelial	0,004245754	down
231495_at	NA	Transcribed locus	0,004245754	down
1559276_at	<i>hCG_38480</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 1	0,004495504	down
239210_at	NA	Transcribed locus	0,00462038	up
201820_at	<i>KRT5</i>	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	0,004745255	down
231849_at	<i>KRT80</i>	keratin 80	0,004745255	up
1559266_s_at	<i>C10orf140///LOC730417</i>	chromosome 10 open reading frame 140///hypothetical protein LOC730417	0,00487013	down
232498_at	<i>KIAA1833</i>	hypothetical protein KIAA1833	0,00487013	up
244846_at	NA	Transcribed locus	0,00487013	down
201110_s_at	<i>THBS1</i>	thrombospondin 1	0,005244755	up
203880_at	<i>COX17</i>	COX17 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)	0,00536963	down
227235_at	NA	CDNA clone IMAGE:5302158	0,00536963	up
217767_at	<i>LOC653879</i>	similar to Complement C3 precursor	0,005494506	down
206631_at	<i>PTGER2</i>	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	0,005494506	up
243200_at	NA	Transcribed locus	0,005619381	down
203824_at	<i>TSPAN8</i>	tetraspanin 8	0,005619381	up
223556_at	<i>HELLS</i>	helicase, lymphoid-specific	0,005869131	up
229069_at	<i>CIP29</i>	cytokine induced protein 29 kDa	0,005994006	down
203508_at	<i>TNFRSF1B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	0,005994006	up
238140_at	<i>ARV1</i>	ARV1 homolog (S. cerevisiae)	0,006618382	down
238681_at	<i>GDPD1</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	0,006868132	up
240390_at	<i>GALNT5</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-	0,007242757	down

Anexo III (cont.). *Probes* diferencialmente expressos nas amostras não-responsivas em relação às amostras responsivas antes da suplementação de calcitriol pela análise Teste-t não-pareado. Os probes destacados em amarelo foram selecionados para validação de expressão por PCR em tempo real.

		acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5)		
229603_at	BBS12	Bardet-Biedl syndrome 12	0,007367632	up
205741_s_at	DTNA	dystrobrevin, alpha	0,007492507	down
240242_at	NA	Transcribed locus	0,007492507	up
221920_s_at	SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	0,007492507	down
1565743_at	NA	CDNA FLJ37648 fis, clone BRHIP2000532	0,007617383	down
1556590_s_at	NA	CDNA FLJ25645 fis, clone SYN00113	0,007992008	down
1561956_at	NA	Full length insert cDNA clone YR73H03	0,007992008	down
206546_at	SYCP2	synaptonemal complex protein 2	0,008241759	up
243824_at	NA	Homo sapiens, clone IMAGE:5213378, mRNA	0,008491509	down
235509_at	C8orf38	chromosome 8 open reading frame 38	0,008866134	down
244473_at	NA	Transcribed locus	0,008866134	up
241884_at	NA	NA	0,00924076	down
238962_at	NA	Full-length cDNA clone CS0DF003YC20 of Fetal brain of Homo sapiens (human)	0,00924076	down
244177_at	NA	Transcribed locus	0,00924076	up
214725_at	RPESP	RPE-spondin	0,00924076	up
219714_s_at	CACNA2D3	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit	0,00949051	down
225763_at	RCSD1	RCSD domain containing 1	0,00949051	down
225373_at	C10orf54	chromosome 10 open reading frame 54	0,009615385	up
239319_at	LOC728342	Hypothetical protein LOC728342	0,009615385	down
209343_at	EFHD1	EF-hand domain family, member D1	0,00974026	up
220122_at	MCTP1	multiple C2 domains, transmembrane 1	0,00974026	down
201107_s_at	THBS1	thrombospondin 1	0,00974026	up

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abbas S, Linseisen J, Slinger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D e Chang-Claude J. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer—results of a large case–control study. *Carcinogenesis* 2008; 29: 93-99.

Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW e Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by arraya CGH indentifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 2000;25:144-146.

Anderson LN, Cotterchi M, Vieth R e Knight JA. Vitamin D and calcium intakes and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 1699-1707.

Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Koeger PE e Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57:234-240.

Beer TM e Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic. *Mol Can Therap* 2004;3:473-381.

Benbow U e Brinkerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* 1997; 15:519-26.

Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC e

Hankinson SE. Plasma 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:1991-1997.

Bolstad, BM, Irizarry R A, Astrand M, and Speed TP. A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics*. 2003; 22:185-193.

Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G e Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102:156-162.

Bortman P, Folgueira MA, Katayama ML, Snitcovsky IM e Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1-9.

Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, Laskey D, Sylvia JS, Hollis BW, Wiess ST e Litonjua AA. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Resp Crit Care Med* 2009; 179: 765-771.

Brown AJ e Slatopolsky E. Vitamin D analogs: Therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol Aspects Med* 2008;doi:10.1016/j.mam.2008.04.001

Brown AJ. Regulation of vitamin D action. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:11-16.

Callens C, Coulon S, Naudin J, Radford-Weiss I, Boissel N, Raffoux E, Wang PH, Agarwal S, Tamouza H, Paubelle E, Asnafi V, Ribeil JA, Dessen P, Canioni D, Chandesris O, Rubio MT, Beaumont C, Benhamou M, Dombret H, Macintyre E, Monteiro RC, Moura IC, Hermine O. Targeting iron homeostasis induces cellular

differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 2010 207:731-750.

Calza S, Raffelsberger W, Ploner A, Sahel J, Leveillard T e Pawitan Y. Filtering genes to improve sensitivity in oligonucleotide microarray data analysis. *Nucleic Acids Research* 2007; 35: e102; doi:10.1093/nar/gkm537.

Camargo A, Ruano J, Fernandez JM, Laurence DP, Jimenez A, Santos-Gonzales M, Marin C, Perez-Martinez, P, Uceda M, Lopez-Miranda J e Perez-Jimenez F. Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC Genomics* 2010; 11:253.

Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton JR, Oram DH e Studd JW. Hormonal profiles after the menopause. *Br Med J* 1976; 2: 784-787.

Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD e Meunier PJ. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderl women. *N Engl J Med*. 1992; 327:1637-1642.

Chen F, Wang Q, Wang X e Studzinski GP. Up-Regulation of Egr1 by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Contributes to Increased Expression of p35 activator of Cyclin-Dependent Kinase 5 and Consequent Onset of the Terminal Phase of HL60 Cell Differentiation. *Cancer Res* 2004; 64: 5425-5433.

Chen J, Bardes EE, Aronow BJ e Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research* 2009; 37: W305-W311.

Chi H, Barry SP, Roth R, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM e Flavell RA. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2274-2279.

Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Hubbell A, Lane D, O'Sullivan M, Cummings S, Rohan T, Yasmeen S e Khandekar J. The women's health initiative randomized trial of calcium plus vitamin D: effects on breast cancer and arthralgias. *J Clin Oncol 2006 ASCO Annul Meeting Proceedings Part I*. Vol 24, n.18S (Supplement) 2006:LBA6.

Cho SJ, Kang MJ, Homer RJ, Kang HR, Zhang X, Lee PJ, Elias JA e Lee CG. Role of early growth response-1 (EGR-1) in interleukin-13-induced inflammation and remodeling. *J Biol Chem* 2006; 281: 8161-8168.

Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X e Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 2003;88:695-705.

Colston KW e Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulator effects of vitamin D in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2002;9:45-59.

Cordeiro JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA e Dusso A. 1,25-Dihydroxyvitamin D downregulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 38965–38971.

Costa JL, Eijk PP, van de Wiel MA, ten Berge D, Schmitt F, Narvaez CJ, Welsh J, Ylstra B. Anti-proliferative action of vitamin D in MCF7 is still active after siRNA-VDR knock-down. *BMC Genomics* 2009; 10: 499.

Christakos S, Prince R. Estrogen, vitamin D, and calcium transport. *J Bone Miner Res* 2003;18: 1737-1739.

Davis ME. The physiology and management of the menopause. In: Marcus SL & Marcus CC. *Advances in Obstetrics and Gynecology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967.

Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA e Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 1997;337:670-676.

De Luca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1689S-1696S.

Durchdewald M, Angel P, Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol Histopathol* 2009; 24: 1451-1461.

Egeblad M e Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.

Eid MA, Kumar MV, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ. Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:2461-2468.

Eil C, Liberman UA e Marx SJ. The molecular basis for resistance to 1,25-dihydroxvitamin D: studies in cells cultured from patients with hereditary hypocalcemic 1,25(OH)2D3-resistant rickets. *Adv Exp Med Biol* 1986; 196: 407-422.

Ellison TI, Smith MK, Gilliam AC e Macdonald PN. Inactivation of the vitamin D receptor enhances susceptibility of murine skin to UV-induced tumorigenesis. *J Invest Dermatol advance online publication*, 29 May 2008; doi:10.1038/jid.2008.131.

Eniu A, Carlson RW, Aziz Z, Bines J, Hotobágyi GN, Bese NS, Love RR, Vickram B, Kurkure A e Anderson BO. Breast cancer in limited-resource countries: treatment and allocation of resources. *Breast* 2006; 12 (suppl.1): S38-53.

Fedirko V, Bostick RM, Flanders WD, Long Q, Sidelnikov E, Shaukat A, Daniel CR, Rutherford RE, Woodard JJ. Effects of vitamin d and calcium on proliferation and differentiation in normal colon mucosa: a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2933-2941.

Fu M, Zhu X, Zhang J, Liang J, Lin Y, Zhao L, Ehrenguber MU, Chen YE. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 2003; 315: 33-341.

Garland CF e Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood fo colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980; 9:227-231.

Garland FC, Garland CF, Gorham ED e Young JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 1990; 19:614-622.

Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States). *Cancer Causes Control* 2005; 16:83-95.

Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J e Hood N. Frequency of vitamin D (VotD) deficiency at breast cancer (BC) diagnosis and association with risk of distant recurrence and death in a prospective cohort study of T1-3, N0-1, MO BC. *J Clin Oncol* 2008; suppl; abstr 5.

Gorrin-Rivas MJ, Arai S, Furutani M, Mizumoto M, Mori A, Hanaki K, Maeda M, Furuyama H, Kondo Y e Imamura M. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Can Res* 2000; 6: 1647-1654.

Haddad JG. Vitamin D – solar rays, the Milky Way, or both? *New Engl J Med* 1992;326:1213-1215.

Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC, Lang R. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* 2006; 203: 15-20.

Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 203-207.

Ho HY, Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res* 2001; 61: 984-990.

Holick MF, Kleiner-Bossaller A, Schnoe HK, Kasten PM, Boyle IT e DeLuca HF. 1,24,25-trihydroxyvitamin D3: a metabolite of vitamin D3 effective on intestine. *J Biol Chem* 1973;248:6691-6696.

Holick MF. Vitamin D and sunlight: Strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;doi: 10.2215/CJN.01350308.

Hong F, Breilting R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL e Chory J. RankProd: A Bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 2006; 22: 2825-2827.

Huang RP, Fan Y, de Belle I, Niemeyer C, Gottardis MM, Mercola D, Adamson ED. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int J Cancer* 1997; 72:102-109.

Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP e Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004;18:2660-2671.

Hurst JH e Hooks SB. Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins in cancer biology. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 1289-1297.

Ilahi M, Armas LAG e Heaney RP. Pharmacokinetics of a single, large dose of cholecalciferol. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 688-691.

Inaba M, Okuno S, Koyama H, Nishizawa Y e Morii H. Effects of uremic serum on 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ -induced differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1991; 37 Suppl:S93-103.

Inca, Instituto Nacional de Câncer, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.

Janowsky EC, Lester GE, Weinber CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA e

Hulka BS. Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Public Health Nutrition* 1999; 2: 283-291.

John EM, Schwartz GG, Koo J, Van Den BD e Ingles SA. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65:5470-5479.

Jones G, Strugnell SA e De Luca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 1998;78:1193-1231.

Kobayashi D, Yamada M, Kamagata C, Kaneko R, Tsuji N, Nakamura M, Yagihashi A, Watanabe N. Overexpression of early growth response-1 as a metastasis-regulatory factor in gastric cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 3963-3970.

Koike Folgueira MA, Brentani H, Carraro DM, De Camargo Barros Filho M, Hirata Katayama ML, Santana de Abreu AP, Mantovani Barbosa E, De Oliveira CT, Patrão DF, Mota LD, Netto MM, Caldeira JR, Brentani MM. Gene expression profile of residual breast cancer after doxorubicin and cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Rep* 2009; 22: 805-813.

Krishnan AV, Peehl DM e Feldman D. Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J Cell Biochem* 2003; 88: 363-371.

Krishnan AV, Swami S, Peng L, Wang J, Moreno J, Feldman D. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 2010; 151: 32-42.

Kustikova O, Kramerov D, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E, Tulchinsky E. Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7095-7105.

Lee HJ, Liu H, Goodman C, Ji Y, Maehr H, Uskokovic M, Notterman D, Reiss M, Suh N. Gene expression profiling changes induced by a novel Gemini Vitamin D derivative during the progression of breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 332-343.

Levin WJ, Press MF, Gaynor RB, Sukhatme VP, Boone TC, Reissmann PT, Figlin RA, Holmes EC, Souza LM, Slamon DJ. Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 1995; 11: 1261-1269.

Lips P. Vitamin D physiology. *Progress Biophys Mol Biol* 2006; 92:4-8.

Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M e Freedma LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomocytic cell line U937. *Genes Dev* 1996;10:142-153.

Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG e Colston W. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentration, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1164-1169.

Lyra EC, da Silva IA, Katayama ML, Brentani MM, Nonogaki S, Goes JC e Folgueira MA. 25(OH)D3 and 1,25(OH)2D3 serum concentration and breast tissue expression of 1alpha-hydroxylase, 24-hydroxylase and vitamin D receptor in women with and without breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;100:184-192.

Lyra EC. Influência da vitamina D na proliferação e na expressão de genes alvo em cancer de mama de pacientes pós-menopausas. [tese]. São Paulo; Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Mawer EB, Walls J, Howell A, Davies M, Ratcliffe WA e Bundred NJ. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D may be related inversely to disease activity in breast cancer patients with bone metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 118-122.

Mackay A, Urruticoechea A, Dixon JM, Dexter T, Fenwick K, Ashworth A, Drury S, Larionov A, Young O, White S, Miller WR, Evans DB, Dowsett M. Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R37.

Menezes RJ, Cheney RT, Husain A, Tretiakova M, Loewen G, Johnson CS, Jayaprakash V, Moysich KB, Salgia R e Reid ME. Vitamin D receptor expression in normal, premalignant, and malignant human lung tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1104-1110.

Milde-Langosch K, Kappes H, Riethdorf S, Löning T, Bamberger AM. FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 265-275.

Mitchner NA, Harris ST. Current and emerging therapies for osteoporosis. *J Fam Pract* 2009; 58(7 Suppl Osteoporosis): S45-49.

Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD e Safford SE. Ribozyme knockdown functionally links a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ membrane binding protein ($1,25\text{D}_3\text{-MARRS}$) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7392-7397.

Newton R, King EM, Gong W, Rider CF, Staples KJ, Holden NS, Bergmann MW. Glucocorticoids inhibit IL-1 β -induced GM-CSF expression at multiple levels: roles for the ERK pathway and repression by MKP-1. *Biochem J* 2010;427:113-124.

Ng K, Meyerhardt JA, Wu K, Feskanich D, Hollis BW, Giovannucci EL e Fuchs CS. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels and survival in patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(18):2984-2991.

Ondková S, Macejová D, Brtko J. Role of dihydroxyvitamin D(3) and its nuclear receptor in novel directed therapies for cancer. *Gen Physiol Biophys* 2006; 25: 339-353.

Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh WJ, Bouter LM e Lips P. Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1052-1058.

Palmieri C, MacGregor T, Girgis S e Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitaminD levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1307-1311.

Patterson KI, Brummer T, O'Brien P M e Daly R J Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J.* 2009; 418: 475-489.

Peehl DM, Seto E, Hsu JY e Feldman D. Preclinical activity of ketoconazole in combination with calcitriol or the vitamin D analogue EB 1089 in prostate cancer cells. *J Urol* 2002; 168: 1583-1588.

Perou CM, Sørlie 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, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.

Poola I, DeWitty RL, Marshalleck JJ, Bhatnagar R, Abraham J e Leffall LD. Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nature Medicine* 2005; 11: 481-483.

Posner BA, Mukhopadhyay S, Tesmer JJ, Gilman AG, Ross EM. Modulation of the affinity and selectivity of RGS protein interaction with G alpha subunits by a conserved asparagine/serine residue. *Biochemistry* 1999; 38: 7773-7779.

Przybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J, Blasiak J. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 95: 65-72.

Ronski K, Sanders M, Burleson JA, Moyo V, Benn P, Fang M. Early growth response gene 1 (EGR1) is deleted in estrogen receptor-negative human breast carcinoma. *Cancer* 2005; 104:925-930.

Salehi F, Turner MC, Phillis KP, Wigle DT, Krewski D e Aronson KJ. Review of the

etiology of breast cancer with special attention to organochlorides as potential endocrine disruptors. *J Toxicol Environm Health* 2008;11:276-300.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7:1-14.

Shabahang M, Buras RR, Davoodi F, Shumaker LM, Nauta RJ e Evans SR. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Res* 1993; 53: 3712-3718.

Skowronski RJ, Peehl DM e Feldman D. Actions of vitamin D3, analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 1995; 136:20-26.

Smyth GK, Yang YH e Speed TP. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods in Molecular Biology* 2003; 224: 111-136.

Sobral RA, Honda ST, Katayama ML, Brentani H, Brentani MM, Patrao DF e Folgueira MA. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS1, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland câncer. *Acta Vet Scand* 2008; 50:27.

Srinivas S e Feldman D. A Phase II trial of calcitriol and naproxen in recurrent prostate cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 3605-3610.

Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Wlaker JR, Wilthire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *PNAS*

2002; 99:4465-4470.

Sternlicht MD, The stromal proteinase MMP-3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98: 137-146.

Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD e Leung DYM. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 699-704.

Swami S, Krishnan AV e Feldman D. 1 α 25-dihydroxyvitamin D3 downregulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:3371-3379.

Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80:49-62.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A e Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7) RESEARCH0034.

Tilyard MW, Spears GF, Thomson J e Dovey S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *N Engl J Med* 1992;326(6):357-62.

Townsend K, Trevino V, Falciani F, Stewart PM, Hewison M e Campbell MJ. Identification of VDR-responsive gene signatures in breast cancer cells. *Oncology*

2006; 71: 111-123.

Tsunoda T, Koh Y, Koizumi F, Tsukiyama S, Ueda H, Taguchi F, Yamaue H, Saijo N, Nishio K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. *Int J Oncol* 2003; 23: 49-59.

Trivedi DP, Doll R e Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation of fractures and mortality in men and women living in the community: randomized double blind controlled trial. *BMJ* 2003; 326: 469-474.

Wali RK, Baum CL, Sitrin MD e Brasitus TA. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D3 stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium *J Clin Invest* 1990; 85: 1296-1303.

Wang B, Khachigian LM, Esau L, Birrer MJ, Zhao X, Parker MI e Hendricks DT. A key role for early growth response-1 and nuclear factor-kB in mediating and maintaining GRO/CXCR2 proliferative signaling in esophageal cancer. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 755-764.

Wang Q, Salman H, Danilenko M e Studzinski GP. Cooperation between antioxidants and $1,25$ -dihydroxyvitamin D3 in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. *J Cell Phys* 2005; 204: 964-974.

Wang YZ, Li H, Bruns ME, Uskokovic M, Truitt GA, Horst R, Reinhardt T e Christakos S. Effect of $1,25,28$ -trihydroxyvitamin D2 and $1,24,25$ -trihydroxyvitamin D3 on intestinal calbindin-D9K mRNA and protein: is there a correlation with intestinal calcium transport? *J Bone Miner Res* 1993; 8: 1483-1490.

Welsh J, Wietzke JA, inser GM, Byrne B, Smith K e Narvaez CJ. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 2003;133:2425-2433S.

Wu JJ, Roth RJ, Anderson EJ, Hong EG, Lee MK, Choi CS, Neuffer PD, Shulman GI, Kim JK e Bennett AM. Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. *Cell Metab* 2006; 4: 61-73.

Wu L, Tanimoto A, Murata Y, Fan J, Sasaguri Y e Watanabe T. Induction of human matrix metalloproteinase-12 gene transcriptional activity by GM-CSF requires the AP-1 binding site in human U937 monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 300-307.

Yang W, Arai S, Gorrin-Rivas MJ, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer*. 2001; 91:1277-1283.

Zehnder D, Bland R, Walker EA, Bradwell AR, Howie AJ, Hewison M, Stewart PM. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2465-2473.