

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA
DIFERENCIAL EM LINHAGENS CELULARES
DE MAMA COM DIFERENTES PERFIS DE
EXPRESSÃO DE *ERBB2* NA PRESENÇA E
AUSÊNCIA DE DOCETAXEL**

MARIANA LOPES DOS SANTOS

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida Nagai

**São Paulo
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

dos Santos, Mariana Lopes

Análise de expressão gênica diferencial em linhagens celulares de mama com diferentes perfis de expressão de *ERBB2* na presença e ausência de docetaxel. / Mariana Lopes dos Santos – São Paulo, 2006.

125p.

Tese(Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ricardo Renzo Brentani

Descritores: 1. CÂNCER DA MAMA. 2. GENE ERBB-2. 3. RESISTÊNCIA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS. 4. EXPRESSÃO GÊNICA.

♪ *Tem dias que eu fico*
Pensando na vida
E sinceramente não vejo saída
Como é, por exemplo
Que dá para entender
A gente mal nasce
Começa a morrer...

Sei lá, sei lá
Só sei que é preciso paixão
Sei lá, sei lá
A vida tem sempre razão. ♪

Sei lá....a vida tem sempre razão.
Vinícius de Moraes/Toquinho

DEDICATÓRIA

À **minha mãe** Lucia Helena, por estar sempre ao meu lado, cuidando de mim e torcendo para que eu realize todos os meus sonhos.

Ao **meu pai** Luiz Henrique, por compartilhar comigo os prazeres e as angústias de fazer pesquisa, e me ajudar a não levar a vida tão a sério.

Ao meu irmão **Eduardo**, a quem recorro sempre que não sei o que fazer, e a minha cunhada **Letícia**, pelo carinho.

À **Maria Aparecida Nagai**, por 10 anos de orientação, que me tornaram uma pesquisadora, não só pelo conhecimento adquirido, mas principalmente pelo amor a ciência que ela me transmitiu.

AGRADECIMENTOS

À **Dra Maria Aparecida Nagai**, pela orientação desse projeto de pesquisa e pelo importante auxílio na construção e análise das bibliotecas de SAGE.

Ao **Prof. Dr Ricardo Renzo Brentani**, pelo apoio que permitiu a conclusão desse trabalho na Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente.

À **Dra Maria Mitzi Brentani**, chefe da Disciplina de Oncologia da FMUSP, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Às queridas amigas do Laboratório de Genética Molecular do Câncer:

Sibeli, por tantos anos de amizade, e pela importante ajuda no repique de bactérias.

Simone, pelo auxílio nas reações de qPCR e pela companhia até mais tarde no laboratório.

Ana Carolina, pela empolgação contagiante.

Karina, pela continuação desse trabalho, e pelos almoços descontraídos.

Diana, pela colaboração na análise de genes identificados nesse trabalho.

Carolina, pela colaboração no seqüenciamento das bibliotecas de SAGE.

Michelle, pelo apoio no dia a dia.

Débora, pela companhia tranqüila na bancada ao lado.

Vivian, por acreditar muito no meu potencial.

Tatiana, pela amizade e o constante apoio.

D. Antônia, pelo auxílio técnico e o bom humor diário.

Bia, por encher o laboratório de alegria.

Aos colegas e amigos que trabalharam no laboratório nestes quatro anos e contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, especialmente à **Cláudia** e à **Nancy**, pela ajuda na cultura de células, discussões científicas e apoio nos momentos difíceis.

À **Georgina**, pelo exemplo de garra e determinação.

Ao **Dr Michael O'Hare** do Instituto Ludwig de Londres (Inglaterra), por ter cedido as linhagens celulares de mama utilizadas nesse estudo.

Ao **Dr Wilson Araújo da Silva Jr** e a sua equipe, em especial ao **Daniel Guariz Pinheiro** e a **Dalila Zanette**, pela criação e gerenciamento da ferramenta de análise dos resultados obtidos pela técnica de SAGE.

Aos membros da banca de qualificação **Dr Alex Fiorini de Carvalho**, **Dra Vilma Regina Martins**, **Dr Ismael Guerreiro da Silva** e **Dra Otávia Caballero**, pelas críticas, comentários e sugestões ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

À **Secretária de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente**, pelos auxílios prestados durante os anos de doutorado.

Aos **funcionários da Biblioteca do Hospital do Câncer A.C. Camargo**, pela importante ajuda na busca de referências bibliográficas. À **Suely Francisco**, pelo auxílio na formatação da tese.

Às **minhas avós** Leonor e Maria, por acharem ótimo tudo o que eu faço!

Às amigas, desde o colégio, **Christina**, **Fabiana** e **Glauce**, que apesar de não entenderem exatamente o que eu faço e, principalmente, por que isso ocupa grande parte do meu tempo, me apóiam e torcem muito por mim.

À **Paula**, minha irmã de convivência e coração, ao **Zé** e ao **meu sobrinho** que está chegando, pelo incentivo a minha carreira, consolo nos momentos difíceis, e tantos momentos felizes compartilhados.

Ao **samba**, que foi a minha terapia semanal durante o doutorado; e aos amigos de samba **Débora, Iza, Claudia, Alexandre, Chico, Tiago, Guilherme e Franklin**, entre tantos outros, que me ajudaram a descarregar o estresse e recuperar as energias.

Às minhas amigas de faculdade **Daniella, Marinalva, Taíssa, Bruna, Camila e Renata**, que estiveram comigo desde o início da minha trajetória na pesquisa e, especialmente, às queridas **Sabrina e Silvia**, que acompanharam passo a passo o desenvolvimento desse trabalho, sofreram e comemoraram comigo, e não me deixaram desanimar.

À **FAPESP**, pela bolsa e auxílios concedidos que permitiram a realização desse trabalho.

A **Santo Expedito** e às **orações da minha avó Maria**, que não falham jamais!

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

RESUMO

dos Santos ML. **Análise de expressão gênica diferencial em linhagens celulares de mama com diferentes perfis de expressão de *ERBB2* na presença e ausência de docetaxel.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de mama é o de maior ocorrência na população feminina e a segunda causa de óbitos por câncer em mulheres. A expressão aumentada do gene *ERBB2* é encontrada em 15-30% dos tumores de mama, e está associada a um pior prognóstico e a quimioresistência a diversas drogas anti-tumorais, incluindo os taxanos, paclitaxel e docetaxel. O docetaxel é, no momento, a droga mais efetiva no tratamento de tumores de mama avançados. Utilizando-se a técnica de SAGE, foi determinado o perfil de expressão gênica de duas linhagens de células de mama normal, HB4a e C5.2, que apresentam diferentes níveis de expressão de *ERBB2*, na ausência e na presença do tratamento intensivo com docetaxel, visando identificar genes associados a quimioresistência. A linhagem celular parental HB4a apresenta expressão basal de *ERBB2*, e a C5.2, é um clone de HB4a, que possui expressão aumentada de *ERBB2*. Um total de 307.506 tags foi gerado ao final do sequenciamento das bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a (81.684 tags; 30.854 tags únicas), HB4a tratada com docetaxel (70.715 tags; 31.546 tags únicas), C5.2 (79.948 tags; 30568 tags únicas) e C5.2 tratada com docetaxel (75.159 tags; 31.293 tags únicas). A comparação do transcriptoma das linhagens celulares HB4a e C5.2 antes e após o tratamento com docetaxel revelou diferenças substanciais no padrão de expressão gênica. Vinte e um genes encontrados diferencialmente expressos nas células HB4a e C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, foram analisados por qPCR. As alterações no padrão de expressão gênica nas células HB4a e C5.2 em resposta ao tratamento com docetaxel, observadas pelo SAGE, foram confirmadas por qPCR na maioria dos genes analisados, que incluem *TPM1*, *SPARC*, *RUVBL1*, *LGALS1* e *MGC11242*. O uso da técnica de SAGE nos permitiu a identificação de um grande número de genes potencialmente regulados por *ERBB2*, que atuam em diversos processos celulares, como proliferação celular,

apoptose, adesão celular e organização de citoesqueleto, e podem estar envolvidos na resistência ao docetaxel. Entretanto, um maior número de estudos experimentais e clínicos deve ser realizado para que seja confirmado o potencial destes genes como marcadores de resposta à quimioterapia em câncer de mama.

SUMMARY

dos Santos ML. **Analysis of differentially expressed genes in normal mammary cell lines expressing different levels of ERBB2 with or without docetaxel.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Breast cancer is the most commonly diagnosed malignancy and the second leading cause of mortality related to cancer in women. Over-expression of *ERBB2* gene occurs in 15-30% of breast tumors and is associated with poor prognosis and chemoresistance to a variety of anticancer drugs, including the taxanes, paclitaxel and docetaxel. Docetaxel is currently the most effective chemotherapeutic drug for the treatment of advanced breast cancer. Using SAGE technique, we obtained the gene expression profiles from two normal mammary cell lines, HB4a and C5.2, expressing different levels of *ERBB2*, before and after intensive exposure to docetaxel, aiming to identify genes involved in chemoresistance. The parental cell line HB4a expresses basal levels of *ERBB2*, and its clone C5.2 expresses high levels of *ERBB2*. A total of 307,506 tags were generated from HB4a (81,684 tags; 30,854 unique tags), HB4a treated with docetaxel (70,715; 31,546 unique tags), C5.2 (79,948 tags; 30,568 unique tags) and C5.2 treated with docetaxel (75,159; 31,293 unique tags). Comparisons of the transcriptome of the cell lines before and after docetaxel exposure revealed substantially different expression patterns. Twenty-one differentially expressed genes between HB4a and C5.2 cell lines, before and after docetaxel treatment, were further analyzed by qPCR. The alterations in the expression patterns in HB4a and C5.2 cell lines in response to docetaxel treatment observed by SAGE analysis were confirmed by qPCR in the majority of genes analyzed, including *TPM1*, *SPARC*, *RUVBL1*, *LGALS1* and *MGC11242*. The use of SAGE technique allowed us to identify a large number of potential *ERBB2* target genes implicated with a variety of cellular processes including cell proliferation, cell adhesion, apoptosis and cytoskeleton organization. However, additional experimental and clinical studies are needed to confirm the predictive value of these genes in chemotherapy response in breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações genéticas associadas a tumorigênese mamária.	3
Figura 2	Esquema ilustrativo simplificado das vias de transdução de sinais ativadas por ERBB2.	7
Figura 3	Esquema ilustrativo da técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).	26
Figura 4	Gel de agarose 1% representativo da integridade dos RNAs extraídos das (A) linhagens celulares HB4a, C3.6 e C5.2 na ausência do tratamento com docetaxel e das (B) células HB4a e C5.2 após o tratamento intensivo com docetaxel.	32
Figura 5	Gel de agarose 2% representativo do cDNA sintetizado na construção da biblioteca da linhagem celular HB4a pela técnica de SAGE.	33
Figura 6	(A) Gel de agarose 2% representativo da amplificação dos ditags de 100 pb por PCR e (B) isolamento destes ditags de 100pb em gel de poliacrilamida 12%, na construção da biblioteca da linhagem celular HB4a pela técnica de SAGE.	35
Figura 7	Géis de poliacrilamida representativos (A) do isolamento dos ditags de 26pb, e (B) dos concatâmeros, formados pela ligação destes ditags de 26pb, na construção da biblioteca de SAGE da linhagem de células HB4a.	36
Figura 8	Gel de agarose 1,5% representativo da amplificação dos clones das três regiões (A) 300-500pb, (B) 500-800pb e (C) 800pb-1kb, selecionadas dos concatâmeros, na construção da biblioteca da linhagem celular HB4a pela técnica de SAGE.	37
Figura 9	(A) Eletrofluorograma representativo da seqüência de um dos clones obtidos na biblioteca de SAGE das células HB4a, que foi submetida na (B) página de internet de análise dos resultados obtidos no sequenciamento das bibliotecas de SAGE geradas, denominada H2G.	38

Figura 10	Análise da expressão relativa do transcrito do gene <i>ERBB2</i> nas células HB4a, C3.6 e C5.2 por PCR em tempo real.	41
Figura 11	Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células HB4a (A) e C5.2 (B) quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.	43
Figura 12	Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células HB4 (A) e C5.2 (B) submetidas ao tratamento intensivo com docetaxel quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.	44
Figura 13	Diagramas de Venn que mostram o número de genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a e C5.2 na ausência e na presença do tratamento intensivo com docetaxel.	45
Figura 14	Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células HB4a antes (A) e após (B) o tratamento intensivo com docetaxel quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.	47
Figura 15	Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células C5.2 antes (A) e após (B) o tratamento intensivo com docetaxel quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.	49
Figura 16	Análise da expressão de 9 genes encontrados diferencialmente expressos na comparação das bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel, por RT-PCR.	54
Figura 17	Análise da expressão relativa do gene <i>ACTN1</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	55
Figura 18	Análise da expressão relativa do gene <i>TPM1</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	56

Figura 19	Análise da expressão relativa do gene <i>SPARC</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	57
Figura 20	Análise da expressão relativa do gene <i>RUVBL1</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	58
Figura 21	Análise da expressão relativa do gene <i>ETFB</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	61
Figura 22	Análise da expressão relativa do gene <i>DUSP1</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	62
Figura 23	Análise da expressão relativa do gene <i>SFRP1</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	64
Figura 24	Análise da expressão relativa do gene <i>MGC11242</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	66
Figura 25	Análise da expressão relativa do gene <i>MATR3</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	67
Figura 26	Análise da expressão relativa do gene <i>LGALS1</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	69
Figura 27	Análise da expressão relativa do gene <i>ANP32B</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	70
Figura 28	Análise da expressão relativa do gene <i>BTGI</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.	71
Figura 29	Análise da expressão relativa do gene <i>HDGF</i> nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em	73

- tempo real.
- Figura 30** Análise da expressão relativa do gene *CAVI* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 74
- Figura 31** Análise da expressão relativa do gene *CENPH* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 76
- Figura 32** Análise da expressão relativa do gene *AES* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 77
- Figura 33** Análise da expressão relativa do gene *C20orf35* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 78
- Figura 34** Análise da expressão relativa do gene *FLJ13448* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 79
- Figura 35** Análise da expressão relativa do gene *FAM98A* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 80
- Figura 36** Análise da expressão relativa do gene *C6orf115* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 83
- Figura 37** Análise da expressão relativa do gene *NDRG1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real. 84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Resumo dos resultados obtidos ao final do sequenciamento das bibliotecas de SAGE das linhagens celulares de mama HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel. 39
- Tabela 2** Genes selecionados na comparação das bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, e validados por qPCR. 50
- Tabela 3** Número de tags, considerando a tag principal, dos genes selecionados para a validação por qPCR, que foram identificados na comparação das bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CT	<i>Threshold Cycle</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato
Doc	docetaxel
ECM	matriz extracelular
EST	etiqueta de seqüência expressa (<i>Expressed Sequence Tags</i>)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
g	grama
Hsp	proteína de choque térmico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kb	quilobase
kDa	quilodáton
LOH	perda de heterozigose
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
nm	nanômetro
nM	nanomolar

ORF	fase aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
qPCR	PCR quantitativa
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa (<i>Reverse Transcriptase</i>)
SAGE	análise seriada da expressão gênica (<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>)
U	unidade
vs	<i>versus</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	2
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo global	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Linhagens celulares	19
3.2	Cultura de células	19
3.2.1	Tratamento das células com docetaxel	20
3.3	Extração de DNA para detecção da presença de apoptose	21
3.3.1	Tratamento do DNA com <i>RNase</i>	22
3.4	Extração de RNA	22
3.4.1	Tratamento do RNA com <i>DNase I</i>	24
3.5	Síntese de cDNA	24
3.5.1	Amplificação do cDNA por PCR	24
3.6	SAGE	25
3.6.1	Construção das bibliotecas de SAGE	25
3.6.2	Seqüenciamento	27
3.6.3	Análise dos resultados obtidos no seqüenciamento dos concatâmeros	27
3.7	Validação	28
3.7.1	Desenho de oligonucleotídeos	28
3.7.2	PCR semi-quantitativa	28
3.7.3	PCR em tempo real (qPCR)	29
4	RESULTADOS	31

5	DISCUSSÃO	87
6	CONCLUSÕES	110
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

ANEXOS

Anexo 1 Dos Santos ML, Palanch CG, Salaorni S, Silva Jr WA, Nagai MA. Transcriptome characterization of human mammary cell lines expressing different levels of *ERBB2* by Serial Analysis of Gene Expression. **Int J Oncol** 2006; 28:1441-61.

Anexo 2 CV Lattes resumido

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o de maior ocorrência na população feminina e a segunda causa de óbitos por câncer em mulheres. Dados epidemiológicos americanos estimam que, em 2005, o câncer de mama tenha sido responsável por 32% dos casos de câncer diagnosticados em mulheres e 15% das mortes causadas pela doença (JEMAL et al. 2005). No Brasil, são esperados 48930 novos casos de câncer de mama em 2006, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2005).

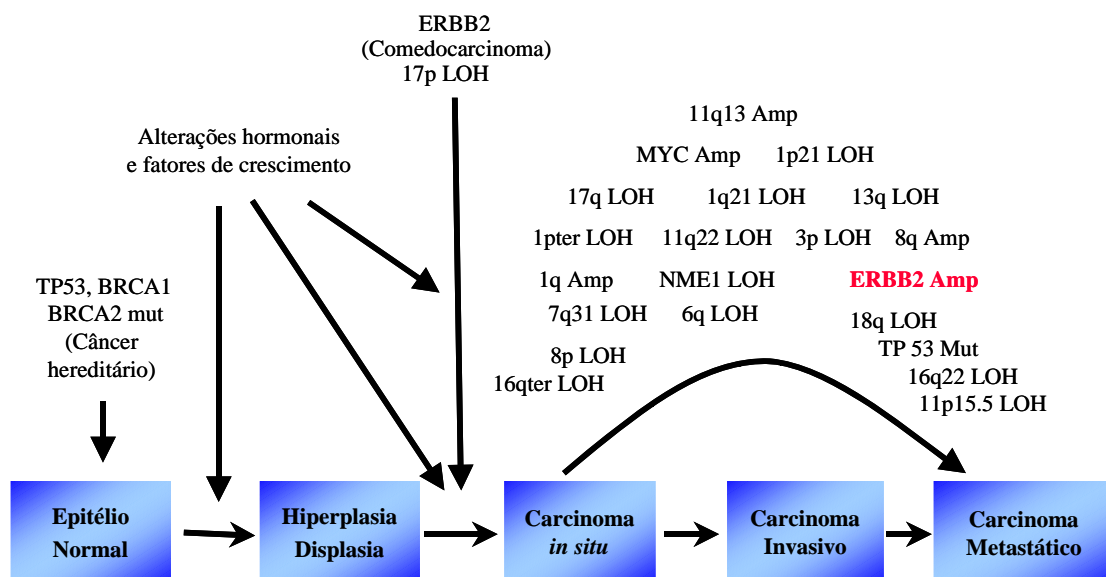
O carcinoma de mama apresenta uma complexa etiologia que envolve fatores exógenos, como dieta, irradiação da mama e contraceptivos orais, e endógenos, como desbalanço hormonal, mastopatias e história familiar (BIÈCHE e LIDEREAU 1995).

Os hormônios esteroídicos, principalmente o estrógeno, desempenham um papel essencial na carcinogênese de mama. Alguns fatores de risco para o câncer de mama estão relacionados aos níveis cumulativos de exposição da mama ao estrógeno, como menarca precoce, menopausa tardia, obesidade (mulheres no período pós-menopausa) e terapia de reposição de hormônio. Fatores protetores contra o desenvolvimento do câncer de mama, que reduzem a exposição da mulher ao estrógeno, são: primeira gravidez em idade jovem, lactação e atividade física (MARTIN e WEBER 2000).

História familiar para o câncer de mama é o principal fator de risco para a doença. Estudos epidemiológicos revelam que 5 a 10% dos casos de câncer de mama são decorrentes de uma susceptibilidade hereditária autossômica dominante. Uma

grande parcela dos casos de câncer de mama familiar pode ser atribuída a alterações nos genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2 (LACROIX e LECLERCQ 2005).

A maior parte dos casos de câncer de mama é esporádica. A tumorigênese de mama envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas que incluem, principalmente, a ativação de oncogenes por amplificação gênica, e a inativação de genes supressores de tumor por mutação, perda de heterozigose (LOH) ou hipermetilção (BIÈCHE e LIDEREAU 1995; INGVARSSON 1999; LACROIX et al. 2004; OSBORNE et al. 2004) (Figura 1).



Fonte: BIÈCHE e LIDEREAU (1995).

Figura 1 - Alterações genéticas associadas a tumorigênese mamária.

A amplificação gênica é um mecanismo frequente em câncer que resulta em aumento da expressão gênica, e desempenha um papel fundamental no processo de transformação maligna da mama. Em tumores de mama, a amplificação gênica mais frequentemente encontrada é a do oncogene *ERBB2*, também chamado de *HER2/neu*.

A amplificação e/ou expressão aumentada de *ERBB2* é observada em 15-30% dos tumores de mama (SLAMON et al. 1987; NAGAI et al. 1993). A expressão aumentada de *ERBB2* em tumores de mama possui uma importância clínica particular, na medida em que está associada a um pior prognóstico da doença, com redução na taxa de sobrevida e do intervalo livre da doença (SLAMON et al. 1987; NAGAI et al. 1993; ROSS e FLETCHER 1998). O aumento da expressão de *ERBB2* parece estimular o potencial metastático de células tumorais (HUNG e LAU 1999). Aproximadamente 25% das pacientes com câncer de mama metastático apresentam expressão aumentada de *ERBB2* (RAVDIN 1999a). Além disso, a expressão aumentada de *ERBB2* tem sido relacionada à resistência a terapia hormonal e a quimioterapia (ROSS e FLETCHER 1998; RAVDIN 1999a; YU e HUNG 2000; CHEN et al. 2003).

O gene *ERBB2* está localizado na região cromossômica 17q11.2-q12 e codifica uma glicoproteína transmembrânica de 185 KDa (p185) com atividade tirosina quinase, que pertence a família dos receptores de fatores de crescimento epidérmicos (EGFR). Essa família de receptores de tirosina quinase (RTK) é composta por outros três membros, *ERBB1*(EGFR), *ERBB3* e *ERBB4* (HOLBRO et al. 2003; MARMOR et al. 2004).

Os membros da família *ERBB* são formados por um domínio extracelular de ligação ao ligante, uma região transmembrânica, e um domínio intracelular que possui sítios de fosforilação e apresenta atividade de tirosina quinase, exceto no gene *ERBB3*, em que este domínio não é funcional (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HOLBRO et al. 2003; MARMOR et al. 2004; HYNES e LANE 2005).

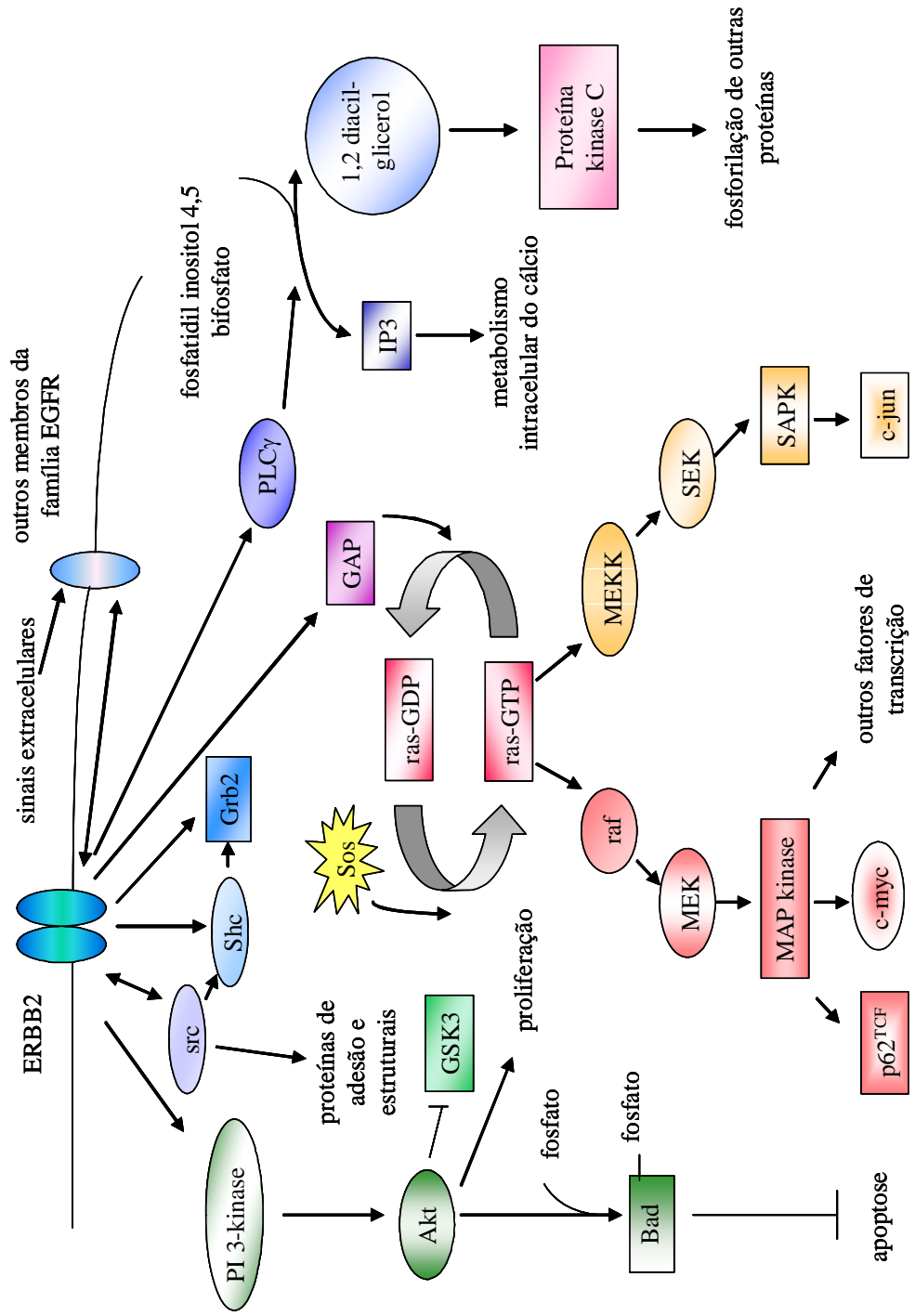
Os membros da família ERBB após ligação aos ligantes se homodimerizam, ou interagem entre si e formam heterodímeros, promovendo a ativação do domínio intracelular com atividade de tirosina quinase, que induz a fosforilação de resíduos de tirosina. Os resíduos de tirosina fosforilados servem de sítios de ligação para diversas proteínas adaptadoras e enzimas, levando à ativação de importantes vias de sinalização intracelulares, que atuam em processos celulares, como proliferação, diferenciação, migração e morte celular (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HOLBRO et al. 2003; ZHOU e HUNG 2003; MARMOR et al. 2004). A composição do dímero e o ligante presente influenciam no padrão de fosforilação da tirosina e determinam quais vias de sinalização serão ativadas (MARMOR et al. 2004; ROSKOSKI 2004).

Os principais ligantes dos membros da família ERBB são: EGF (fator de crescimento epidérmico), AR (amfiregulina) e TGF α (fator de crescimento transformado alfa), específicos de ERBB1 (EGFR); BTC (betacelulina), HB-EGF (heparina-ligante EGF) e EPR (epiregulina), que se ligam a ERBB1 e ERBB4; e NRGs (neuregulinas) que podem se ligar a ERBB3 e ERBB4 (NRG-1 e NRG-2) ou apenas a ERBB4 (NRG-3 e NRG-4) (HOLBRO et al. 2003; MARMOR et al. 2004; ROSKOSKI 2004).

Ainda não foi identificado um ligante específico do gene ERBB2 em tecido mamário, entretanto é considerado o parceiro preferencial e mais efetivo na formação de heterodímeros com os outros membros da família ERBB e seus ligantes (GRAUS-PORTA et al. 1997). Acredita-se que a expressão aumentada do gene ERBB2 possa promover sua dimerização espontânea, o que levaria à ativação constitutiva desse gene e, conseqüentemente, das vias de sinalização por ele ativadas (HARRIS et al.

1999; HUNG e LAU 1999; HOLBRO et al. 2003). O gene ERBB2, quando ativado, interage com diferentes proteínas celulares importantes nas vias de transdução de sinais, desempenhando um papel fundamental na regulação de processos como proliferação e morte celular. As principais vias de sinalização ativadas pelo gene ERBB2 são a do fosfatidilinositol-3-quinase – Akt quinase (PI3K-Akt), a do Ras - proteína quinase ativada por mitógenos (Ras-MAPK) e a da fosfolipase C – proteína quinase C (PLC-PKC) (HUNG e LAU 1999; YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HOLBRO et al. 2003; ZHOU e HUNG 2003; MARMOR et al. 2004) (Figura 2).

Estudos *in vitro* utilizando modelos celulares têm se mostrado de grande valia na elucidação dos mecanismos envolvidos nos processos de tumorigênese. Visando uma melhor compreensão do papel desempenhado pela expressão aumentada do gene ERBB2 no tecido mamário, HARRIS et al. (1999) geraram linhagens celulares de mama normal, que apresentam expressão moderada (C3.6) ou aumentada (C5.2) de *ERBB2*, a partir de uma linhagem de célula epitelial luminal mamária humana imortalizada, não transformada, estabelecida por STAMPS et al. (1994), que tem expressão basal de *ERBB2* (HB4a). Apesar das células que possuem expressão aumentada de *ERBB2* apresentarem evidências de transformação *in vitro*, como a perda de inibição por contato do crescimento, estudos *in vivo* mostraram que estas células não são capazes de formar tumores em camundongos, sugerindo que outros eventos devam atuar no processo de tumorigênese mamária (HARRIS et al. 1999).



Fonte: HUNG e LAU (1999)

Figura 2 - Esquema ilustrativo simplificado das vias de transdução de sinais ativadas por ERBB2.

Um estudo realizado com as mesmas células HB4a, C3.6 e C5.2, que expressam diferentes níveis de *ERBB2*, mostrou que a expressão aumentada de *ERBB2* desempenha um papel importante na desregulação do ciclo celular, levando ao aumento dos sinais proliferativos dependente ou não da presença de mitógenos (TIMMS et al. 2002).

Estudos experimentais mostraram que a expressão aumentada do gene *ERBB2* provoca um aumento no potencial tumorigênico e metastático de células de câncer de mama (BENZ et al. 1993; HUNG e LAU 1999); e a introdução do gene *ERBB2* em camundongos transgênicos induz a formação de tumores de mama e a ocorrência de metástase (GUY et al. 1992; ANDRECHEK et al. 2003). Resultados experimentais obtidos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os efeitos da ação do gene *ERBB2* na tumorigênese mamária são abolidos através do uso de inibidores de tirosina quinase, oligonucleotídeos antisense, anticorpos monoclonais (CHEN et al. 2003) e RNA de interferência (CHOUDHURY et al. 2004).

O *ERBB2* é considerado um excelente alvo terapêutico, pois sua expressão está aumentada em uma grande parcela dos tumores de mama, mas não no tecido normal, participa do processo de transformação maligna da mama, e está diretamente associado ao prognóstico em câncer de mama.

O potencial do *ERBB2* no tratamento do câncer de mama tem sido observado no uso da Herceptina (trastuzumab), que é um anticorpo monoclonal com ação direta contra *ERBB2*, que tem mostrado alta efetividade nos tumores de mama metastáticos com expressão aumentada deste gene. Entretanto, o tratamento com Herceptina não é eficaz em todos os tumores de mama que apresentam expressão aumentada de *ERBB2*. Apenas um terço, aproximadamente, das pacientes com câncer de mama

metastático responde a Herceptina (CHEN et al. 2003; HYNES e LANE 2005; RABINDRAN 2005) e, cerca de 50% das pacientes tratadas com a Herceptina combinada a agentes quimioterápicos, como os taxanos, apresenta resultados satisfatórios (CHEN et al. 2003; RABINDRAN 2005). A razão de muitos tumores, com expressão elevada de ERBB2, serem resistentes ao tratamento com Herceptina permanece desconhecida, no entanto, pode estar relacionada ao fato da ligação da Herceptina no domínio extracelular de ERBB2 não prevenir completamente a sua dimerização, e conseqüentemente, a ativação de vias de sinalização (HYNES e LANE 2005). Além disso, a sensibilidade ao tratamento com Herceptina parece estar associada à presença de amplificação do gene ERBB2 (KAURANIEMI et al. 2004; RABINDRAN 2005).

Até o presente momento, o trastuzumab (Herceptina) é o único agente aprovado (desde 1998) para o tratamento específico de tumores de mama metastáticos que apresentam expressão aumentada de ERBB2, entretanto, um segundo anticorpo monoclonal, o pertuzumab, que age impedindo diretamente a dimerização de ERBB2, e alguns inibidores de tirosina quinase, estão em fase de testes (RABINDRAN 2005; HYNES e LANE 2005).

Apesar dos avanços no conhecimento das bases moleculares do câncer de mama, a quimioterapia continua sendo o tratamento mais utilizado nos casos de câncer de mama metastático. Diversos estudos têm sido realizados visando à identificação de agentes quimioterápicos mais adequados a cada tumor a ser tratado, com o objetivo de otimizar a resposta ao tratamento, aumentar a sobrevida do paciente, com uma menor interferência na qualidade de vida. Na última década do século 20, um grande número de novos agentes terapêuticos tornou-se disponível a

avaliação clínica. Entre eles, destacam-se os taxanos, paclitaxel (Taxol) e docetaxel (Taxotere).

O paclitaxel é um constituinte natural do teixo Pacífico (*Taxus brevifolia*) e o docetaxel é um derivado semi-sintético de um taxano extraído do teixo europeu (*Taxus baccata*). Os taxanos se ligam aos microtúbulos e interferem na formação do fuso mitótico normal, uma vez que, inibem a despolimerização da tubulina e promovem a junção dos microtúbulos (GELMON 1994).

Um dos interesses do uso dos taxanos está no fato de apresentarem atividade anti-tumoral efetiva em pacientes com tumores de mama refratários ou resistentes ao tratamento com antraciclinas (BURRIS 1999; RAVDIN 1999b). Apesar dos taxanos, paclitaxel e docetaxel, apresentarem mecanismos de ação semelhantes, algumas características os diferenciam. O docetaxel apresenta uma maior afinidade de ligação a tubulina do que o paclitaxel (CROWN 2001; HERBST e KHURI 2003; GLIGOROV e LOTZ 2004). Enquanto o docetaxel interfere na organização do centróssomo, agindo em três fases do ciclo celular (S/G₂/M), o paclitaxel atua diretamente no fuso mitótico, na fase G₂/M do ciclo celular (FULTON e SPENCER 1996; CROWN 2001; GLIGOROV e LOTZ 2004). O docetaxel induz a fosforilação de Bcl-2, e conseqüentemente a morte celular por apoptose, a uma concentração cem vezes menor do que a requerida pelo paclitaxel (HERBST e KHURI 2003; GLIGOROV e LOTZ 2004). O docetaxel é eliminado mais lentamente do que o paclitaxel, e dessa forma, fica retido por mais tempo nas células (CROWN 2001; HERBST e KHURI 2003; GLIGOROV e LOTZ 2004). Tanto o paclitaxel quanto o docetaxel são drogas bastante eficazes no tratamento do câncer de mama metastático,

porém o docetaxel tem atividade anti-tumoral superior ao paclitaxel (CROWN 2001; GLIGOROV e LOTZ 2004).

Entre os principais efeitos adversos do tratamento com docetaxel estão a neutropenia e retenção de fluídos. A neutropenia é o primeiro efeito adverso, dose-limitante do docetaxel, que ocorre em mais de 90% dos pacientes que recebem 100mg/m² deste quimioterápico, mas é reversível. A retenção de fluidos pode ser prevenida com o tratamento prévio das pacientes com corticosteróides (FULTON e SPENCER 1996; GLIGOROV e LOTZ 2004).

Devido a sua potente atividade anti-tumoral, aliada à alta reversibilidade de seus efeitos adversos, o docetaxel é considerado um dos agentes mais potentes no tratamento do câncer de mama metastático.

Os resultados obtidos em um estudo clínico de fase III, com 326 pacientes com câncer de mama metastático, que comparou a eficácia dos tratamentos com docetaxel e doxorubicina, como agentes únicos, mostraram, no tratamento com docetaxel, uma resposta satisfatória em 48% das pacientes, enquanto apenas 33% responderam ao tratamento com doxorubicina (CHAN et al. 1999).

Em um estudo clínico de fase III com docetaxel como agente único no tratamento de pacientes com câncer de mama metastático, resistentes ao tratamento com antraciclina, foi observada uma resposta global de 30 a 42% (BURRIS 1999). O uso do docetaxel no tratamento de pacientes com câncer de mama metastático refratário a antraciclina tem mostrado um aumento na sobrevida global dessas pacientes (NABHOLTZ et al. 2002).

O tratamento com docetaxel, combinado a outros agentes citotóxicos também tem mostrado resultados satisfatórios no tratamento do câncer de mama metastático.

O uso combinado de docetaxel e doxorubicina como tratamento inicial em pacientes com doença metastática resultou em taxa de resposta global de 57 a 77% em estudos clínicos de fase I e II (NABHOLTZ 1999).

O uso do docetaxel foi aprovado pelo FDA (“Food and Drug Administration”) e, desde 1999, é tido como referência no tratamento no câncer de mama metastático (HAMILTON e HORTOBAGYI 2005).

O maior obstáculo para o sucesso do tratamento do câncer por quimioterapia é a resistência, intrínseca ou adquirida pelos tumores, aos agentes citotóxicos utilizados no tratamento. As células cancerosas, quando expostas a drogas anti-tumorais são induzidas a expressarem um conjunto de genes capazes de conferir resistência a essas drogas, permitindo que algumas células escapem da morte e formem tumores recorrentes resistentes. No contexto celular, o aumento na velocidade de eliminação ou a inativação da droga, o incremento na atividade de reparo, alterações em alvos das drogas e a desregulação no processo de apoptose, levam a resistência a drogas citotóxicas (PUSZTAI et al. 1999).

Uma parcela considerável das pacientes tratadas com docetaxel não apresenta uma resposta satisfatória ao tratamento, apesar de sofrerem com os efeitos colaterais do tratamento, e os mecanismos envolvidos na aquisição de resistência a esta droga pelos tumores permanecem mal compreendidos.

Alguns mecanismos identificados parecem contribuir para a resistência ao tratamento com docetaxel pelas células tumorais: (1) aumento da expressão do gene de resistência a múltiplos medicamentos (mdr-1), associado à produção aumentada da glicoproteína-P, que condiciona a saída de vários fármacos da célula (FULTON e SPENCER 1996; McDONALD et al. 2005); (2) alterações na tubulina (FULTON e

SPENCER 1996; SHALLI et al. 2005); (3) redução da expressão de p27 (BROWN et al. 2004); (4) amplificação da região cromossômica 7q e perda do braço longo do cromossomo 10 (McDONALD et al. 2005).

A expressão aumentada do oncogene ERBB2 também tem sido associada à resistência ao tratamento com os taxanos, paclitaxel e docetaxel. Linhagens celulares de câncer de mama que apresentam expressão aumentada de ERBB2 são mais resistentes a agentes quimioterápicos, como o paclitaxel e o docetaxel, do que células com baixa expressão desta oncoproteína (YU et al. 1998; CIARDIELLO et al. 2000). Além disso, células com expressão aumentada de ERBB2, transfectadas com genes que inibem a expressão deste gene, mostraram uma resposta mais efetiva ao tratamento com taxanos (UENO et al. 1997).

Estudos que avaliaram o efeito da expressão aumentada de ERBB2 na sensibilidade a diferentes agentes quimioterápicos, incluindo os taxanos, em linhagens celulares de câncer de mama (PEGGRAM et al. 1997) e em células epiteliais mamárias normais (ORR et al. 2000) mostraram que somente a expressão aumentada de ERBB2 não é suficiente para induzir resistência a drogas nestas células, sugerindo que alterações na quimiosensibilidade celular dependem não só do nível de expressão de ERBB2, mas também de sua associação com outras alterações genéticas presentes nas células tumorais.

Embora o papel desempenhado pelo ERBB2 na resistência ao tratamento com docetaxel no câncer de mama ainda não tenha sido elucidado, o envolvimento da expressão aumentada de ERBB2 neste processo pode ser claramente observado no sucesso do tratamento de tumores de mama ERBB2-positivos com docetaxel combinado a Herceptina (NABHOLTZ e GLICOROV 2005).

A identificação de genes associados ao ERBB2, que participem da regulação da sensibilidade ou resistência a quimioterapia em câncer de mama, mostrou-se necessária, tendo sido facilitada e impulsionada pelo desenvolvimento de diversas técnicas robustas para a análise de expressão gênica, como PCR em tempo real (qPCR), Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR), Microarrays e SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”). Essas técnicas de análise de expressão gênica diferem, principalmente, no número de amostras que podem ser analisadas, e no nível de informação gerada, tornando-as complementares, e não excludentes; e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens particulares.

As técnicas de microarray e SAGE têm sido amplamente utilizadas na comparação do perfil de expressão gênica de diferentes populações de células, como normais/tumorais ou resistentes/sensíveis a determinada terapia, enquanto a análise da expressão gênica por PCR em tempo real tem sido empregada com sucesso na validação de genes de interesse identificados por esses dois métodos.

Em câncer de mama, até o presente momento, as análises de expressão gênica que utilizaram a técnica de SAGE representam uma parcela pequena, se comparadas às que empregaram o método de microarrays. No entanto, a técnica de SAGE possui um interesse particular devido a sua capacidade de fornecer tanto informações qualitativas quanto quantitativas dos transcritos, sejam eles conhecidos ou não, de um determinado tecido ou tipo celular. Dessa forma, torna-se possível a identificação de transcritos ainda não clonados, ou parcialmente seqüenciados.

A técnica de SAGE foi proposta por VELCULESCU et al. (1995), e baseia-se em três princípios: (1) uma seqüência de 9 a 14 pares de bases (pb) de uma região definida do transcrito, denominada tag, contém informação suficiente para identificar

um transcrito; (2) estas tags podem ser ligadas formando concatêmeros, que são clonados e seqüenciados; (3) o nível de expressão de um transcrito é quantificado pelo número de vezes que a tag que o representa é observada.

A expressão aumentada do gene *ERBB2* em câncer de mama tem sido o alvo de muitos estudos de análise de expressão gênica em tumores e linhagens celulares, utilizando a técnica de microarray, o que tem permitido a identificação de genes que podem desempenhar funções importantes no desencadeamento e progressão da tumorigênese mamária (WILSON et al. 2002; KUMAR-SINHA et al. 2003; MACKAY et al. 2003; BERTUCCI et al. 2004; WHITE et al. 2004; LANDIS et al. 2005). A comparação do perfil de expressão gênica de tumores de mama que apresentaram diferentes respostas ao docetaxel tem auxiliado na identificação de genes associados a quimiosensibilidade e quimioresistência ao docetaxel em câncer de mama (CHANG et al. 2003; IWAO-KOIZUMI et al. 2005; CHANG et al. 2005), no entanto, a participação de *ERBB2* na aquisição de resistência ao docetaxel ainda não foi diretamente abordada por esses estudos.

A identificação de um conjunto de genes, representativos do padrão de expressão gênica induzido por docetaxel, pela técnica de SAGE, em células de mama em cultura, que expressam diferentes níveis de *ERBB2* pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos associados a tumorigênese e a quimioresistência, mediada pela sinalização de *ERBB2*, na mama.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GLOBAL

- Analisar a expressão gênica diferencial em linhagens de células de mama normal com diferenças na expressão de *ERBB2*, na ausência e na presença de docetaxel, visando identificar genes associados a quimioresistência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil de expressão gênica das linhagens celulares de mama normal, HB4a, que apresenta expressão basal do gene *ERBB2*, e C5.2, que possui expressão aumentada de *ERBB2*, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, pela técnica de SAGE.
2. Comparar o perfil de expressão gênica, obtido nas quatro bibliotecas geradas pela técnica de SAGE, e selecionar genes encontrados diferencialmente expressos entre elas, que possam representar potenciais marcadores de resistência ao docetaxel, mediada pelo *ERBB2*.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas as linhagens de células de mama normal humanas, HB4a, C3.6 e C5.2, cedidas gentilmente pelo Dr. Michael O'Hare (LICR/UCL Breast Cancer Laboratory, London). A HB4a é uma linhagem de célula epitelial luminal de mama imortalizada, não transformada, com expressão basal de *ERBB2* (STAMPS et al. 1994). As linhagens celulares C3.6 e C5.2 foram derivadas da transfecção das células HB4a com o gene *ERBB2*, e apresentam expressão moderada e elevada, respectivamente, de *ERBB2* (HARRIS et al. 1999).

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

As células HB4a, C3.6 e C5.2, foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma), contendo antibiótico-antimicótico (100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estroptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina B) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), e 5µg/ml de hidrocortisona e de insulina. As linhagens celulares foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

A ausência de contaminação das linhagens celulares HB4a, C3.6 e C5.2 com *Mycoplasma sp.* foi verificada utilizando-se o kit Mycoplasma Plus™ PCR Primer Set (Stratagene).

Ao atingirem a confluência, as células foram subcultivadas através da tripsinização (solução de tripsina 0,25%/EDTA 0,03%) para a separação das células. Uma parte destas células foi transferida para novas garrafas para a ampliação da cultura celular, e outra parte foi ressuspensa em solução de congelamento (meio de cultura L15 contendo 10% de soro fetal bovino e de DMSO), e estocada em nitrogênio líquido.

3.2.1 Tratamento das células com docetaxel

As linhagens celulares HB4a e C5.2 foram tratadas com docetaxel (Taxotere; Aventis Pharmaceuticals). O Taxotere foi diluído em etanol absoluto, originando soluções estoque de 10^{-2} M e 10^{-3} M, que foram armazenadas a -20°C . As diluições de uso do docetaxel (10^{-4} M ou 10^{-5} M) foram feitas em meio de cultura, no momento do tratamento, e descartadas logo após o uso.

As células HB4a e C5.2 foram submetidas a uma intensa exposição ao docetaxel, através da administração de doses progressivas da droga (0,005-2 μ M) a cada 24 horas. Este tratamento foi repetido três vezes na HB4a e duas vezes na C5.2.

Um segundo tratamento das linhagens celulares HB4a e C5.2 com docetaxel foi realizado com as doses de 20 e 100nM de Taxotere, por 24 horas.

As células controle foram tratadas com a mesma quantidade de etanol absoluto sem o docetaxel. A quantidade de etanol absoluto no meio de cultura celular foi inferior a 0,1%.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE APOPTOSE

O DNA das células HB4a e C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, foi extraído a partir de células em suspensão recuperadas do meio de cultura celular.

As células foram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspendidas em 0,5 ou 1 ml de TES (Tris-HCl 10mM, pH 7.5, SDS 0.6%, EDTA 1mM) e 100µg/ml de proteinase K. Após 2 horas de incubação a 42°C (ou 14-16 horas a 37°C) foi adicionado primeiramente um volume de fenol saturado pH 7-8 e depois um volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), seguidas de agitação por inversão durante 5 minutos. Centrifugou-se a 10000 rpm por 20 minutos. A seguir, foi retirado o infranadante mantendo a interfase, e acrescentou-se mais um volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Os procedimentos de agitação e centrifugação foram repetidos. A seguir, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante evitando a interfase. O material foi, então, precipitado com acetato de sódio 0.3M pH 5.2 e etanol absoluto (2.5 volumes), por 14 a 16 horas a -20°C. Após este período, o material foi centrifugado por 20 minutos a 10000 rpm, e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado um volume de etanol 75%, e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o precipitado seco ao ar e ressuspendido em água. O material foi analisado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

3.3.1 Tratamento do DNA com *RNase*

O DNA foi submetido ao tratamento com *RNase* para a remoção de RNA contaminante. Ao DNA foram adicionados cloreto de sódio 0,02M e 0,1 mg/ml de *RNase A*. Após incubação de 30 minutos a 37°C, seguida de 5 minutos a 65°C, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3M e 2,5 volumes de etanol absoluto, por 14-16 horas, a -20°C. A seguir, foi realizada centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75%. Após centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado seco ao ar e ressuspendido em água.

Terminado o processo, o material foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, incluindo um marcador de peso molecular de 100 pares de bases. A presença de apoptose foi detectada pela fragmentação internucleossomal do DNA.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi obtido por extração pelo método da guanidina-fenol/clorofórmio (CHOMCZYNSK e SACCHI 1987).

As células aderidas ao frasco de cultura foram lavadas três vezes com solução de PBS-A (NaCl 8,2 g, KCl 0,2 g, Na₂PO₄, 2H₂O 1,15 g, KH₂PO₄ 0,2 g, H₂O qsp 1 litro). Após a última lavagem, a solução de PBS-A foi completamente retirada e foi adicionado, às células aderidas ao frasco, 1 ml de solução D gelada (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sódio, pH 7, 0,5% sarcosil, 0,1 M β-mercaptoetanol). A solução foi homogeneizada até total lise celular, e em seguida, transferida para um

tubo Nalgene, no qual adicionou-se: (1) 0,1 ml de acetato de sódio 2 M pH 4, (2) 1 ml de fenol saturado pH 5 e (3) 0,2 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1). Após a adição de todos os reagentes, o tubo foi agitado vigorosamente por inversão por 10 segundos. A seguir, a amostra foi mantida no gelo por 15 minutos, e então submetida a centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo Nalgene e precipitada com igual volume de isopropanol, por 14-16 horas a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. A seguir, adicionou-se 300µl de solução D gelada ao precipitado para sua total dissolução. A solução foi transferida para um microtubo de 1,5 ml e nova precipitação foi efetuada com 300 µl de isopropanol por 14-16 horas a -20 °C. O material foi, então, centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 75% gelado, e nova centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos foi realizada. O sobrenadante foi desprezado, e o precipitado seco e ressuspendido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Toda a vidraria utilizada neste procedimento foi esterilizada em uma mufla por 4 horas a 250 °C.

A concentração do RNA total extraído foi determinada por leitura em espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Biosciences) a 260/280nm, e a qualidade (integridade) do material foi analisada em gel de agarose 1% contendo formaldeído. O RNA extraído foi guardado a -70°C.

3.4.1 Tratamento do RNA com *DNase I*

O RNA extraído foi submetido ao tratamento com a enzima *DNase I* para a remoção de uma possível contaminação com DNA. Foi utilizada 1u/μg(RNA) da enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega), conforme as instruções do fabricante. Após o período de incubação de 1 hora a 37°C, o material tratado foi precipitado por 16 horas a - 20°C, com acetato de sódio 0,2M pH 4 e 2,5 volumes de etanol absoluto. A seguir, as amostras foram centrifugadas, a 10000 rpm, por 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi, então, lavado com etanol 75%, centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco e ressuspendido em água.

3.5 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 10μg de RNA total, tratado com *DNase I*, utilizando-se o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.1 Amplificação do cDNA por PCR (Reação em cadeia da Polimerase)

Para a verificação de qualidade e massa do cDNA sintetizado, foi feita a sua amplificação utilizando-se oligonucleotídeos para o gene *β-2-microglobulina* (TAPLIN et al. 1995). Além disso, foi verificada a presença de contaminação por DNA genômico residual através da amplificação do cDNA sintetizado com oligonucleotídeos para os exons 1 a 3 do gene *TP53* (SASA et al. 1994), que resulta

em fragmentos com tamanhos diferentes na amplificação do cDNA (375 pb) e do DNA genômico (585 pb).

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25µl, contendo 0,1µg de cDNA, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8.3, 1mg/ml de gelatina, 1,5mM de MgCl₂, 125µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, quantidade adequada de cada oligonucleotídeo e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. A amplificação foi realizada em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por 1 ciclo de extensão por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

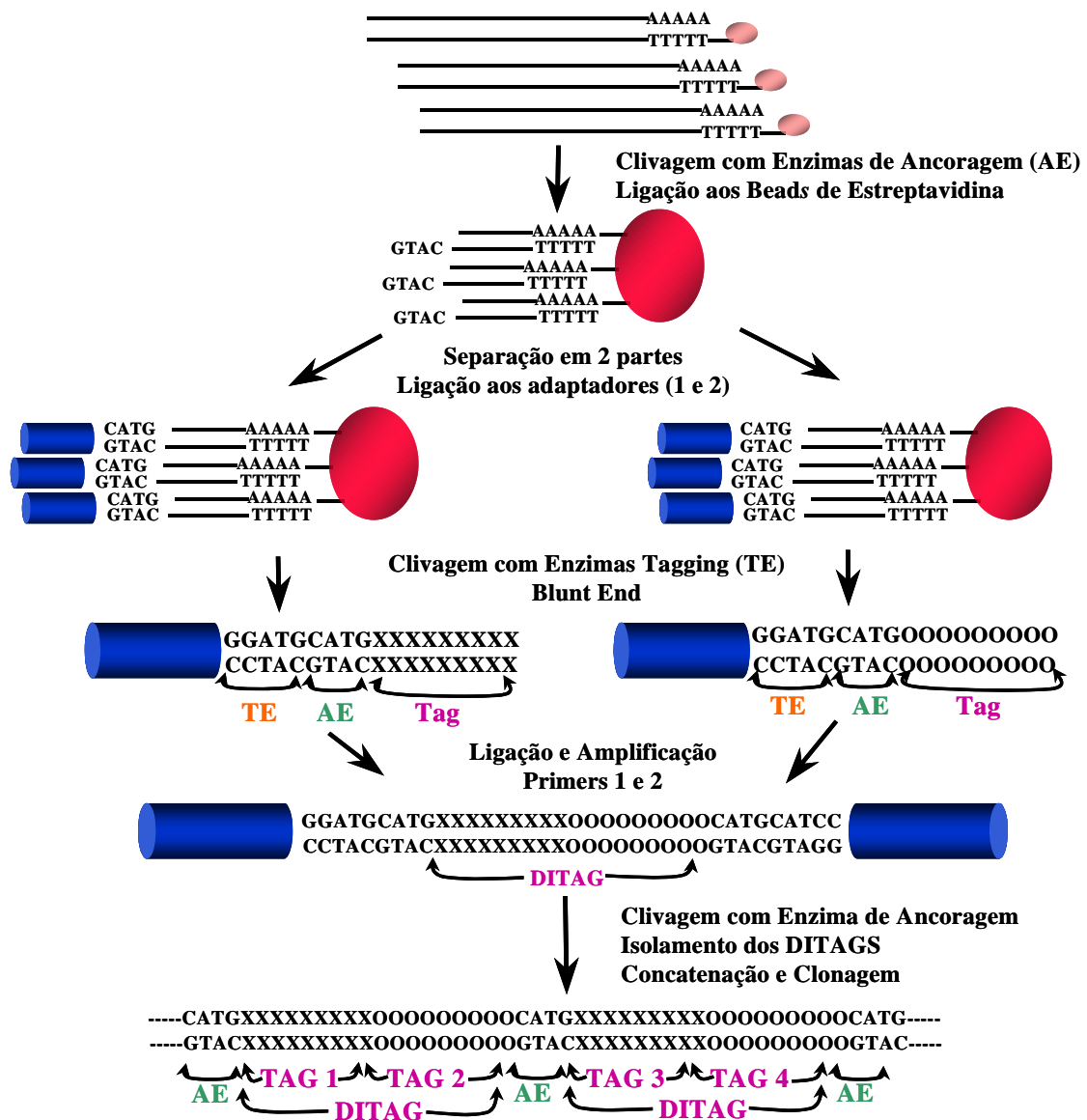
3.6 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

3.6.1 Construção das bibliotecas de SAGE (VELCULESCU et al. 1995)

As bibliotecas de SAGE foram construídas utilizando-se o Kit I-SAGE™ (Invitrogen).

A partir do RNA total extraído das células HB4a e C5.2, antes e após exposição intensiva ao docetaxel, submetido ao tratamento com a enzima *DNase I*, foi realizada a síntese de cDNA, utilizando-se oligo-dT biotilado. O cDNA formado foi clivado com a enzima *Nla* III (enzima de ancoragem), e os fragmentos 3' foram isolados com os "beads" magnéticos. Os fragmentos separados foram divididos em duas alíquotas e ligados via sítio de restrição de ancoragem a um dos dois adaptadores, contendo sítios para enzimas de restrição tipo IIS (enzima para formação de tags). Os produtos resultantes da digestão com a enzima para formação

de tags (*BsmF I*) foram ligados e, a seguir, amplificados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada adaptador. Os produtos amplificados foram clivados pela enzima de ancoragem formando os “ditags”. Os “ditags” foram ligados formando os concatêmeros, que foram clonados e seqüenciados (Figura 3). O protocolo detalhado da técnica de SAGE, que foi seguido, pode ser encontrado no endereço de internet do fabricante do kit, www.invitrogen.com.



Fonte: VELCULESCU et al. (1995).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da técnica de SAGE.

3.6.2 Seqüenciamento

O seqüenciamento dos concatâmeros foi realizado em um seqüenciador de DNA automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), utilizando-se o Kit ET Dye Terminator (Amersham Biosciences), e o oligonucleotídeo sense do M13, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.6.3 Análise dos resultados obtidos no seqüenciamento dos concatâmeros

A análise dos resultados obtidos foi realizada através de uma ferramenta criada e gerenciada pelo Dr Wilson A. Silva Jr, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, disponibilizada na internet (www.gdm.fmrp.usp.br/h2g), chamada H2G (Hyper and Hypoexpressed Genes). A partir das seqüências dos concatâmeros depositadas na página do H2G, foi feita a extração e a tabulação da ocorrência das tags através do software de análise do SAGE. A identificação das tags foi realizada utilizando-se duas ferramentas, o SAGEmap (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>) e o CGAP SAGE Genie (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). Para a comparação das bibliotecas de SAGE geradas foi feita a normalização das bibliotecas comparadas usando como referência a que apresenta o maior número de tags.

A anotação funcional dos genes encontrados diferencialmente expressos nas bibliotecas de SAGE geradas foi realizada manualmente utilizando as ferramentas disponíveis na página de internet do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov), como PubMed, Gene, UniGene e OMIM.

3.7 VALIDAÇÃO

3.7.1 Desenho de oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos foram desenhados para a amplificação dos genes selecionados, na comparação das bibliotecas de SAGE, por RT-PCR. A partir da seqüência dos transcritos selecionados, foram desenhados oligonucleotídeos para uma região entre exons, capazes de amplificar somente o gene de interesse, com o auxílio do algoritmo blat (www.genome.ucsc.edu). O tamanho do produto amplificado pelos oligonucleotídeos desenhados variou de 100 a 180 pares de bases.

3.7.2 PCR semi-quantitativa

Os cDNAs sintetizados a partir dos RNAs obtidos das linhagens celulares foram amplificados por PCR. A reação de PCR foi feita em um volume final de 25 μ l, contendo 0,025 μ g de cDNA, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8.3, 1mg/ml de gelatina, 1,5mM de MgCl₂, 125 μ M de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, quantidade adequada definida para cada oligonucleotídeo e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. A amplificação foi realizada em 28 ou 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por 1 ciclo de extensão por 5 minutos a 72°C. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle interno de massa na reação. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

3.7.3 PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa dos transcritos diferencialmente expressos foi realizada por PCR em tempo real. Foram utilizados os cDNAs obtidos a partir do RNA total extraído das células HB4a e C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, oligonucleotídeos específicos desenhados para os transcritos a serem analisados e o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação e a detecção dos fragmentos amplificados foi feita utilizando-se o ABI 5700 Detection System (Applied Biosystems).

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante SYBR Green que se intercala a dupla fita do DNA. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento no sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado. As amostras foram analisadas em duplicata.

O nível de expressão gênica foi determinado pela seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre a média do CT da amostra amplificada para o gene alvo e a média do CT da mesma amostra amplificada para o gene referência (*GAPDH*), e $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT da amostra de interesse e o ΔCT da amostra utilizada como referência.

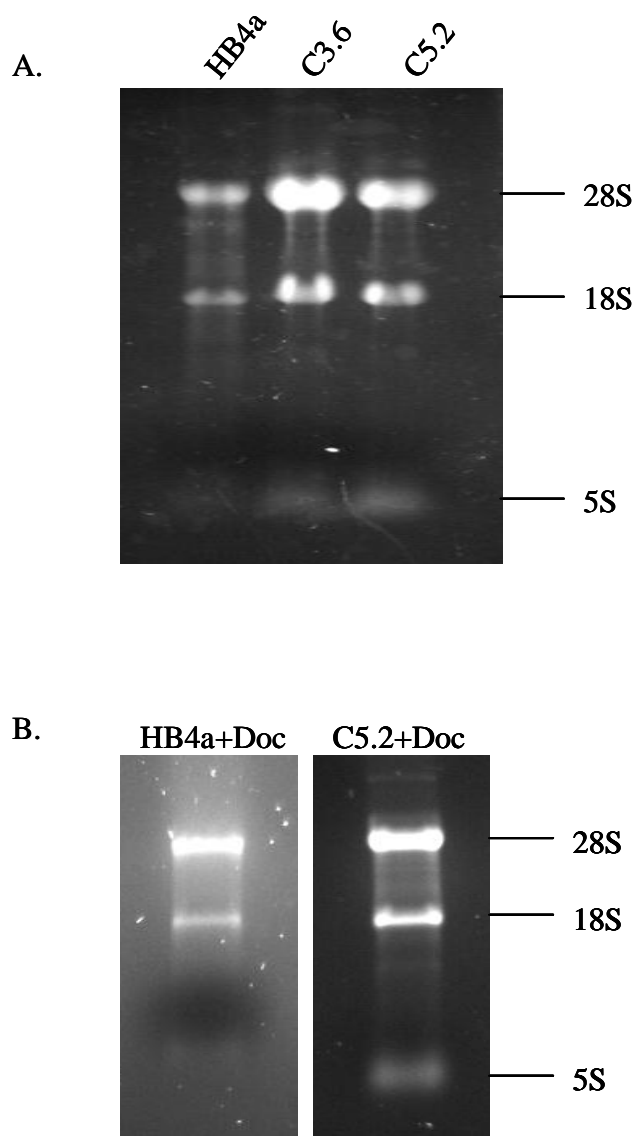
RESULTADOS

4 RESULTADOS

O perfil de expressão gênica das linhagens celulares de mama com expressão basal (HB4a) e aumentada (C5.2) do gene *ERBB2*, antes e após o tratamento com docetaxel, foi analisado pela técnica de SAGE, visando a identificação de genes associados a quimioresistência mediada por *ERBB2*.

As linhagens celulares HB4a e C5.2 foram submetidas ao tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel (0,005-2 μ M) a cada 24 horas, como descrito em Material e Métodos. A escolha de um tratamento intensivo, com a administração de concentrações crescentes de docetaxel, foi feita com o intuito de selecionar as células resistentes a esse tratamento. A observação das células durante o tratamento mostrou, conforme esperado, uma maior sensibilidade das células HB4a ao tratamento com docetaxel em relação às células C5.2. Ao longo do tratamento, foi observada a presença de apoptose nas células HB4a e C5.2, através da extração de DNA de células em suspensão, recuperadas do meio de cultura celular. A extração do RNA da linhagem celular HB4a foi realizada após a administração de 250nM de docetaxel. As células C5.2 foram mais resistentes às doses mais altas da droga, e o RNA desta linhagem celular foi obtido após a administração de 1 μ M de docetaxel. Foi realizada a extração de RNA das linhagens celulares HB4a, C3.6 e C5.2 na ausência do tratamento com docetaxel. A integridade dos RNAs extraídos das linhagens celulares na ausência e na presença do tratamento com docetaxel foi visualizada em gel de agarose 1% contendo formaldeído (Figura 4). Todos os RNAs obtidos foram submetidos ao tratamento com a enzima *DNase I* e a ausência de

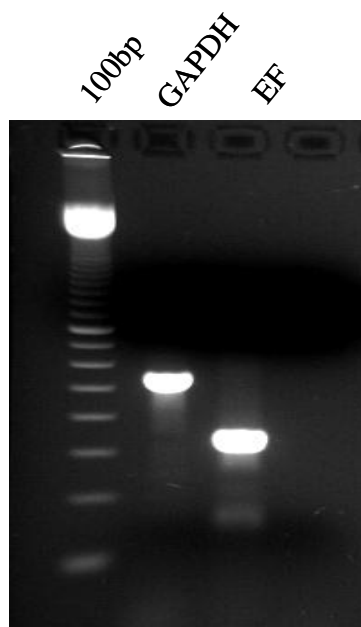
contaminação por DNA foi verificada, conforme descrito no item Material e Métodos.



Legenda: Doc – docetaxel

Figura 4 - Gel de agarose 1% representativo da integridade dos RNAs extraídos das (A) linhagens celulares HB4a, C3.6 e C5.2 na ausência do tratamento com docetaxel e das (B) células HB4a e C5.2 após o tratamento intensivo com docetaxel.

A partir de 25µg do RNA total obtido das linhagens celulares HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, foram geradas bibliotecas de SAGE utilizando o kit I-SAGE, conforme descrito na seção de Material e Métodos. Primeiramente foi feita a síntese de cDNA utilizando-se oligo (dT) biotilado (Figura 5). A seguir, o cDNA sintetizado de cada linhagem celular, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, foi clivado com a enzima de ancoragem *Nla* III, ligado aos adaptadores, e novamente clivado, desta vez com a enzima para a formação de tags *BsmF* I, formando ditags de 100pb.



Legenda: O cDNA sintetizado foi amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos dos genes GAPDH e EF.

Figura 5 - Gel de agarose 2% representativo do cDNA sintetizado na construção da biblioteca da linhagem celular HB4a pela técnica de SAGE.

Foram realizadas 200 reações de amplificação dos ditags de 100pb por PCR (Figura 6a). O material não utilizado foi armazenado para ser amplificado posteriormente, caso fosse necessário. Os ditags de 100pb foram isolados em gel de

poliacrilamida (Figura 6b), eluídos e, então, digeridos com a enzima de ancoragem *Nla* III, formando ditags de 26pb. Esses ditags de 26pb formados, após serem isolados por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 7a), foram ligados gerando concatâmeros. Os concatâmeros foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 7b) e três regiões do gel foram recortadas e utilizadas para a seleção de grupos de fragmentos: (1) 300-500pb, (2) 500-800pb, e (3) 800pb-1kb. Os concatâmeros de diferentes tamanhos foram clonados no vetor pZErO[®]-1 e utilizados para a transformação de *E. coli*, através de eletroporação. Os clones obtidos dos três grupos (1) 300-500pb (Figura 8a), (2) 500-800pb (Figura 8b) e (3) 800pb-1kb (Figura 8c) foram seqüenciados. Obtivemos uma média de 20 tags por clone seqüenciado. Para cada biblioteca gerada, foram seqüenciadas em torno de 40 placas com 96 clones.

A análise dos resultados obtidos pelo seqüenciamento das bibliotecas das células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, geradas pela técnica de SAGE, foi realizada através de uma ferramenta disponibilizada na internet (“H2G: Hyper and Hypoexpressed Genes”), criada e gerenciada pelo Dr Wilson A. Silva Jr., conforme mencionado em Material e Métodos. As seqüências obtidas de cada biblioteca gerada (Figura 9a) foram submetidas no formato FASTA, na página do H2G (Figura 9b), onde as tags foram extraídas das seqüências, tabuladas de acordo com a ocorrência e identificadas por comparação com o banco de dados de SAGE, disponível na página de internet do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foram geradas tabelas que contém a seqüência da tag obtida, o número de identificação do UniGene, o símbolo e a descrição do gene a que corresponde (se houver), e o número de vezes que esta tag aparece.

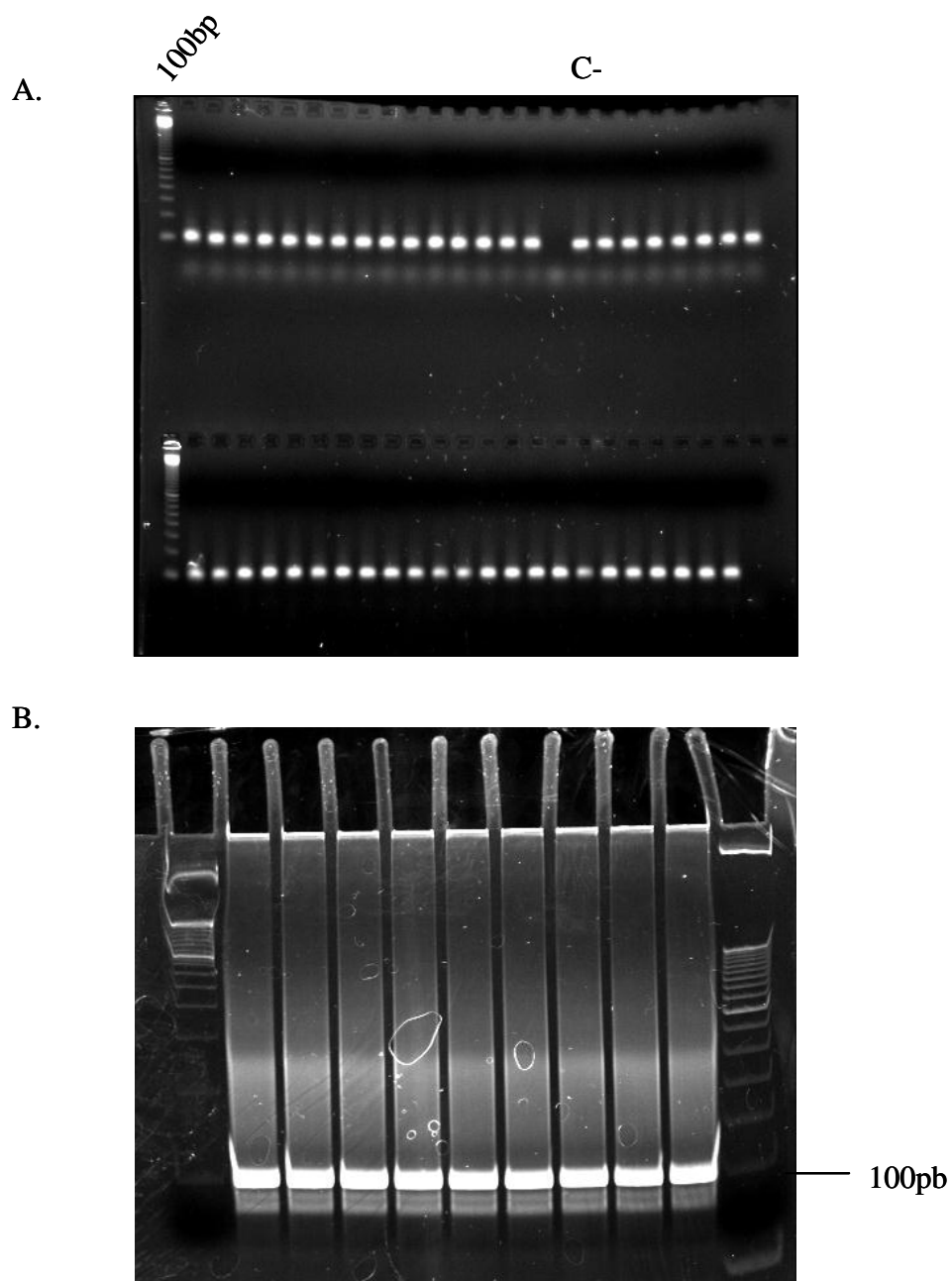


Figura 6 - (A) Gel de agarose 2% representativo da amplificação dos ditags de 100 pb por PCR e (B) isolamento destes ditags de 100pb em gel de poliacrilamida 12%, na construção da biblioteca da linhagem celular HB4a pela técnica de SAGE.

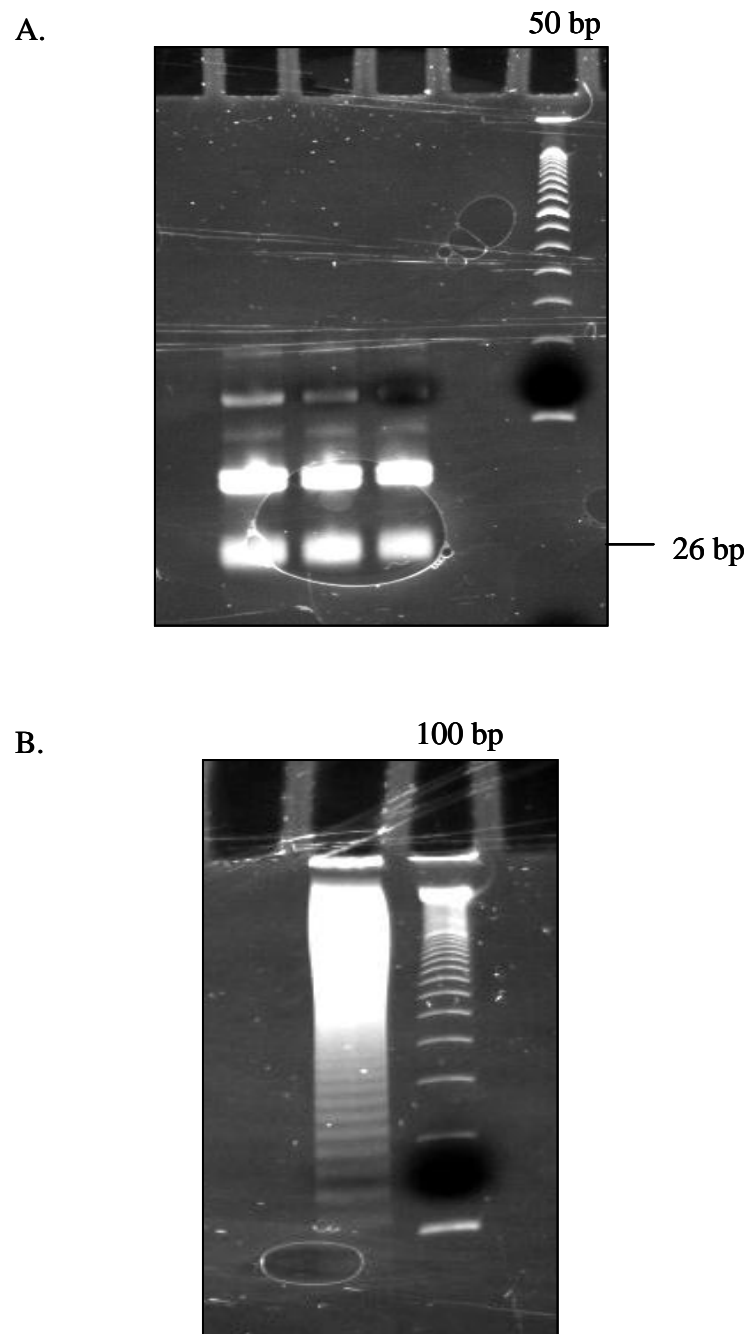


Figura 7 - Géis de poliacrilamida representativos (A) do isolamento dos ditags de 26pb, e (B) dos concatâmeros, formados pela ligação destes ditags de 26pb, na construção da biblioteca de SAGE da linhagem de células HB4a.

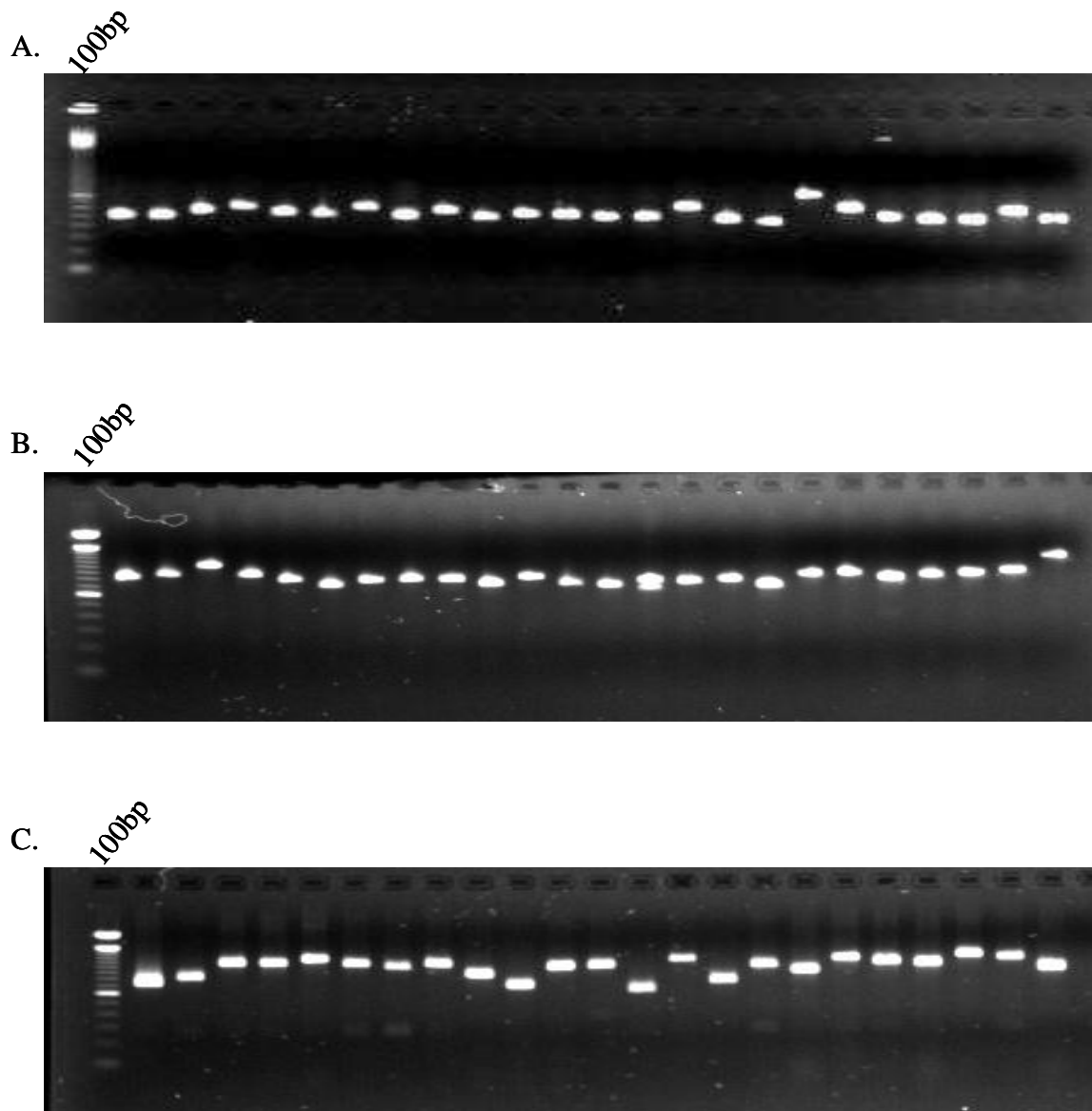
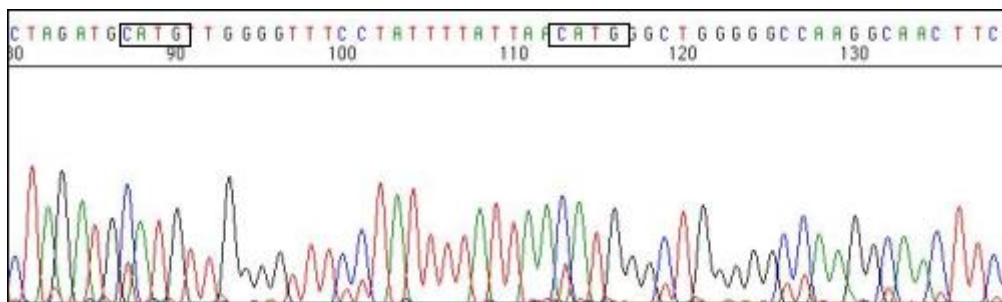


Figura 8 – Gel de agarose 1,5% representativo da amplificação dos clones das três regiões (A) 300-500pb, (B) 500-800pb e (C) 800pb-1kb, selecionadas dos concatâmeros, na construção da biblioteca da linhagem celular HB4a pela técnica de SAGE.

A.



B.

Legenda: (A) CATG – sítio de reconhecimento da enzima de ancoragem *Nla* III, que separa as tags; (B) H2G (“Hyper and Hypoexpressed Genes”) - página de internet criada e gerenciada pelo Dr Wilson Silva Jr

Figura 9 – (A) Eletrofluorograma representativo da seqüência de um dos clones obtidos na biblioteca de SAGE das células HB4a, que foi submetida na (B) página de internet de análise dos resultados obtidos no sequenciamento das bibliotecas de SAGE geradas, denominada H2G.

Um total de 307.506 tags foi gerado ao final do sequenciamento das bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a (81.684 tags; 30.854 tags únicas; 20.108 tags anotadas; 7.952 tags-genes), HB4a tratada com docetaxel (70.715 tags; 31.546 tags únicas; 20.576 tags anotadas; 8.161 tags-genes), C5.2 (79.948 tags; 30568 tags únicas; 19.968 tags anotadas; 7.894 tags-genes) e C5.2 tratada com docetaxel (75.159 tags; 31.293 tags únicas; 20.308 tags anotadas; 8.145 tags-genes) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos ao final do sequenciamento das bibliotecas de SAGE das linhagens celulares de mama HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel.

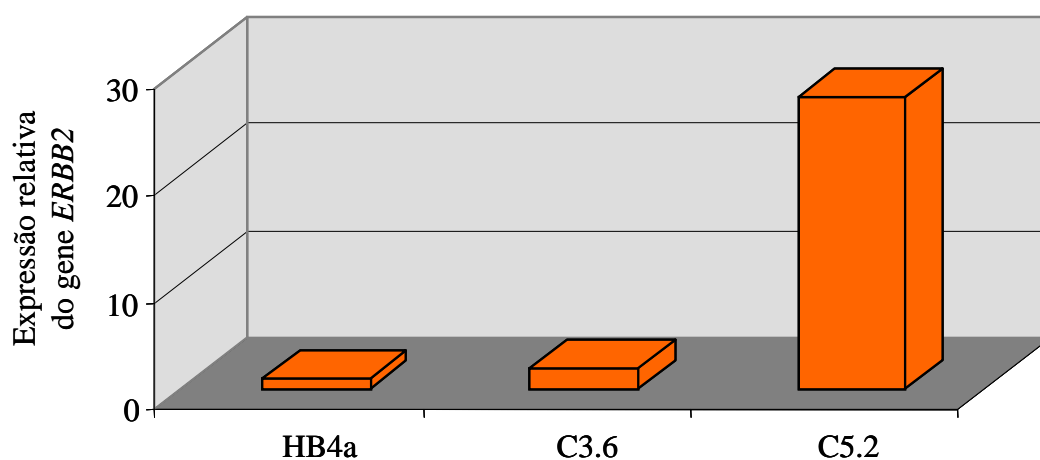
	HB4a		C5.2	
	-Doc*	+Doc*	-Doc*	+Doc*
No. total de tags	81.684	70.715	79.948	75.159
Tags únicas	30.854	31.546	30.568	31.293
Tags anotadas	20.108	20.576	19.968	20.308
Tag-gene	7.952	8.161	7.894	8.145

*Docetaxel

Em uma primeira avaliação da qualidade das bibliotecas geradas, foi verificada a expressão do *GAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), que é um gene constitutivo, e do gene *ERBB2*, que é o alvo deste estudo. A análise das bibliotecas de SAGE de HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, mostrou que a tag do gene *GAPDH* é uma das mais abundantes nas quatro bibliotecas construídas, e a razão da expressão deste gene na comparação das bibliotecas de HB4a e C5.2, tanto na ausência quanto na presença do tratamento, é igual a 1. A análise do gene *ERBB2* nas bibliotecas de SAGE obtidas, confirmou a

expressão diferencial deste gene nas duas linhagens celulares estudadas, a C5.2 apresentou um número de tags do gene *ERBB2* 86 vezes maior do que o observado na HB4a. A expressão diferencial do gene *ERBB2* nas células HB4a e C5.2 foi confirmada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). Após normalização para o gene referência utilizado (*GAPDH*), como descrito em Material e Métodos, foi observada uma expressão relativa do gene *ERBB2* 27 vezes maior na linhagem celular C5.2 comparada a HB4a, utilizada como amostra referência (calibrador) (Figura 10). A linhagem celular C3.6, que apresenta expressão moderada de *ERBB2*, apresentou uma expressão relativa de *ERBB2* duas vezes maior em relação a HB4a (Figura 10). Esses resultados asseguram a qualidade das bibliotecas geradas pela técnica de SAGE, que mostraram estar normalizadas, possibilitando a comparação entre as bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a e C5.2, na presença e na ausência do tratamento com docetaxel.

A comparação do perfil de expressão gênica das células HB4a e C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, foi realizada utilizando-se o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença no número de tags que representa um transcrito, ou seja, na expressão gênica. Todas as análises foram feitas considerando a tag principal (identificada manualmente), isto é, aquela situada mais próxima da extremidade 3', que é a tag mais representativa de cada transcrito. Os 200 transcritos mais diferencialmente expressos, em cada uma das comparações entre as células na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, foram anotados de acordo com a função biológica, utilizando os termos do Gene Ontology (GO).



Legenda: O cDNA das células HB4a foi utilizado como amostra referência. As barras representam a expressão relativa de *ERBB2* nas células HB4a, C3.6 e C5.2, após normalização com o gene de referência, *GAPDH*, como descrito na seção Material e Métodos.

Figura 10 – Análise da expressão relativa do transcrito do gene *ERBB2* nas células HB4a, C3.6 e C5.2 por PCR em tempo real.

A análise comparativa dos transcritos obtidos nas bibliotecas das células HB4a e C5.2 na ausência do tratamento com docetaxel, considerando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica, revelou 334 transcritos mais expressos na HB4a, sendo que 9,6% destes transcritos são ESTs (“Expressed Sequence Tag”), e 328 mais expressos na C5.2, dos quais 13,4% são ESTs. A anotação funcional dos transcritos mais diferencialmente expressos mostrou que as células C5.2, comparadas às HB4a, apresentaram uma maior porcentagem de genes envolvidos em apoptose (C5.2, 9% vs HB4a, 1%), transporte (C5.2, 10% vs HB4a, 5%), processamento de RNA (C5.2, 8% vs HB4a, 4%) e proteína “folding” (C5.2, 6% vs HB4a, 1%). As células HB4a, por sua vez, em relação às C5.2, apresentaram

mais genes envolvidos na transdução de sinal (HB4a, 18% vs C5.2, 10%). Genes diferencialmente expressos que participam da organização de citoesqueleto foram encontrados exclusivamente nas células HB4a (5%) (Figura 11).

Na comparação dos transcritos gerados nas bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a e C5.2 após o tratamento com docetaxel, utilizando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica, foram observados 414 transcritos mais expressos nas células HB4a tratada com docetaxel e 291 mais expressos nas C5.2 submetidas ao tratamento com docetaxel. Entre estes transcritos diferencialmente expressos nas linhagens celulares tratadas com docetaxel, 25,1% dos mais expressos na C5.2 correspondem a ESTs, enquanto na HB4a, apenas 11,6% dos transcritos diferencialmente expressos são ESTs. A anotação dos transcritos mais diferencialmente expressos entre as linhagens celulares HB4a e C5.2 após o tratamento com docetaxel, de acordo com a função biológica, revelou na C5.2 tratada com docetaxel uma maior quantidade de genes que participam de transporte (C5.2 tratada, 12% vs HB4a tratada, 4%) e regulação da transcrição (C5.2 tratada, 14% vs HB4a tratada, 8%). A linhagem celular HB4a após tratamento com docetaxel, em relação às células C5.2 tratadas com docetaxel, apresentou uma maior porcentagem de genes envolvidos na adesão celular (HB4a tratada, 10% vs C5.2, 3%), transdução de sinal (HB4a tratada, 20% vs C5.2 tratada, 11%) e ciclo celular (HB4a tratada, 6% vs C5.2, 3%). Genes diferencialmente expressos que participam de resposta imune foram encontrados exclusivamente nas células HB4a tratadas com docetaxel (6%) (Figura 12).

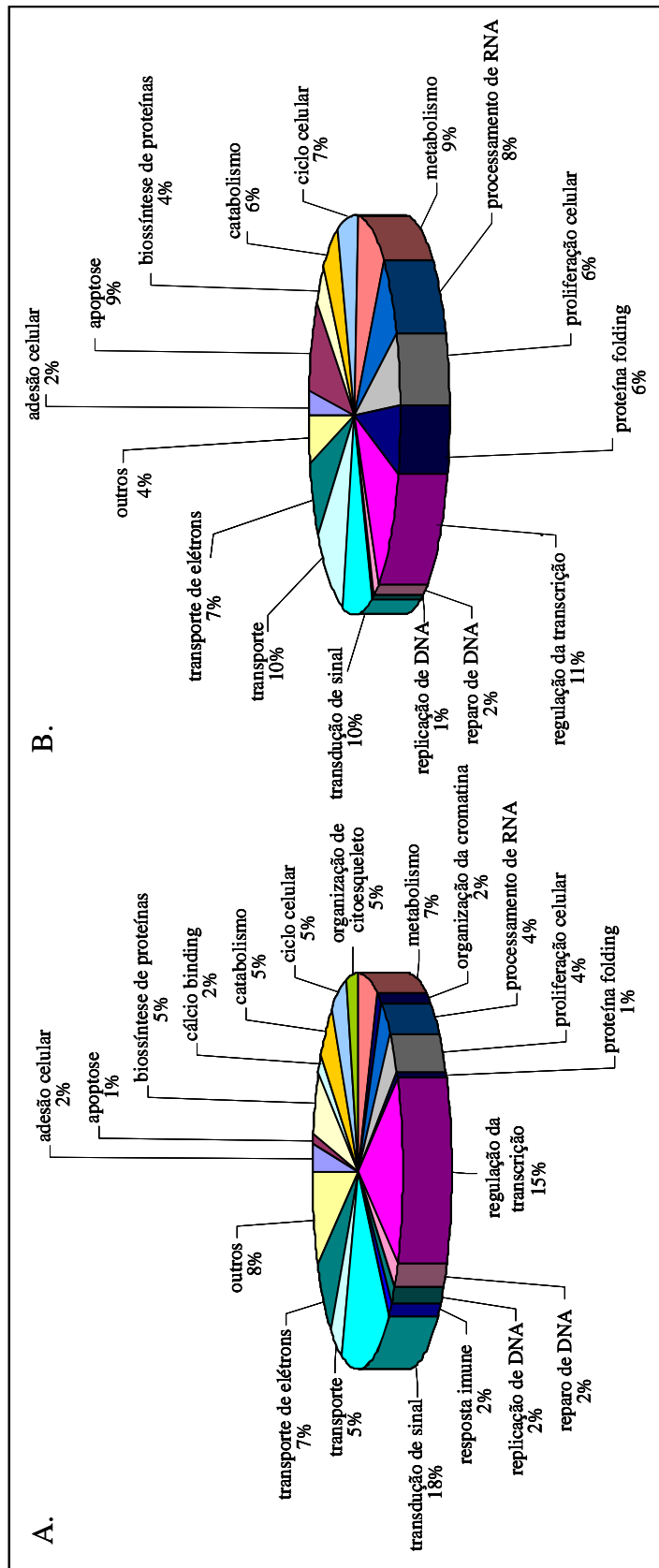


Figura 11 - Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células HB4a (A) e C5.2 (B) quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.

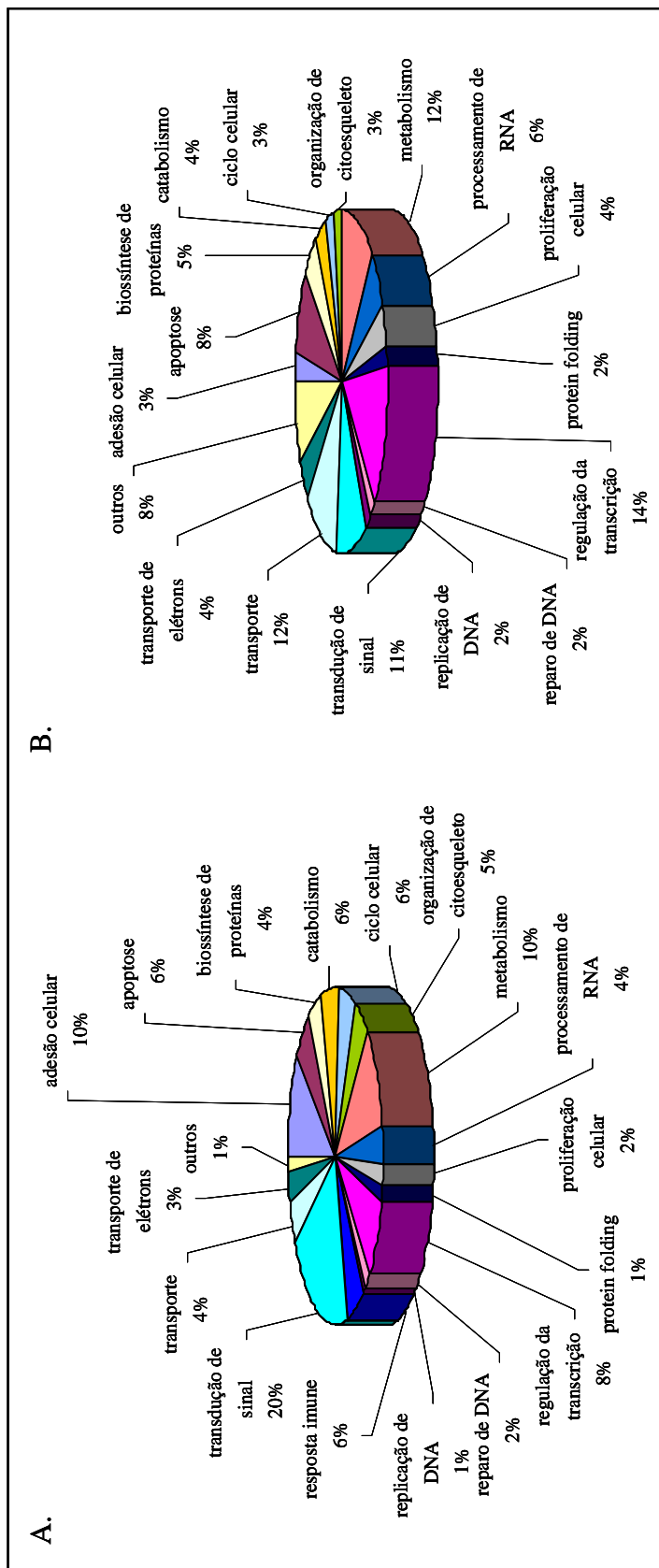
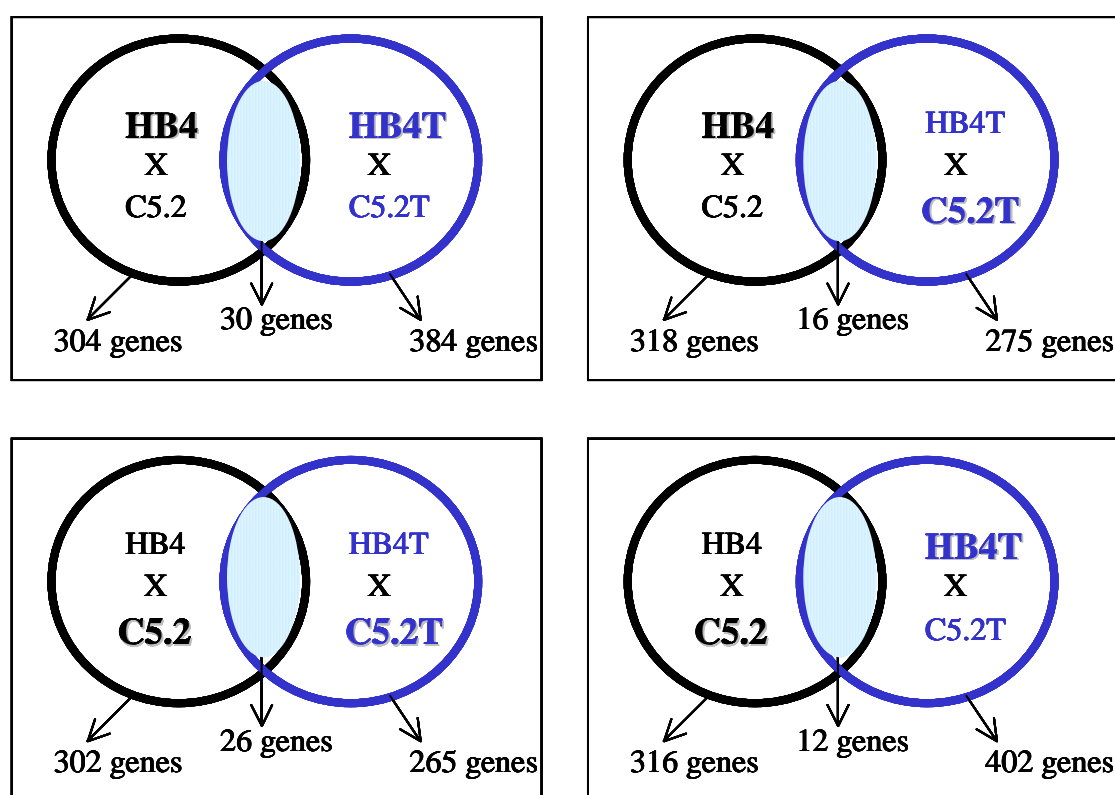


Figura 12 - Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células HB4 (A) e C5.2 (B) submetidas ao tratamento intensivo com docetaxel quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.

A comparação do transcriptoma das linhagens celulares HB4a e C5.2 antes e após o tratamento com docetaxel revelou diferenças substanciais no padrão de expressão gênica. Entre os genes diferencialmente expressos nas células HB4a e C5.2 após o tratamento com docetaxel, apenas 84 genes também apareceram diferencialmente expressos nas linhagens celulares antes do tratamento com docetaxel (Figura 13).



Legenda: Nos diagramas de Venn estão sendo representados os genes mais diferencialmente expressos nas linhagens celulares que estão mostradas em destaque, considerando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica. T – tratada com docetaxel.

Figura 13 – Diagramas de Venn que mostram o número de genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a e C5.2 na ausência e na presença do tratamento intensivo com docetaxel.

Cada uma das linhagens celulares (HB4a e C5.2) foi comparada antes e após o tratamento com docetaxel. Considerando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica, foram observados 396 transcritos (12,9% correspondem a ESTs) mais expressos nas células HB4a na ausência de tratamento e 389 (8,7% são ESTs) após o tratamento com docetaxel. A anotação funcional dos genes mais diferencialmente expressos entre as células HB4a antes e após o tratamento com docetaxel mostrou na ausência do tratamento um maior número de genes que participam de metabolismo (HB4a, 16% vs HB4a tratada, 9%), processamento de RNA (HB4a, 5% vs HB4a tratada, 2%), proteína “folding” (HB4a, 4% vs HB4a tratada, 1%), regulação da transcrição (HB4a, 12% vs HB4a tratada, 7%) e transporte (HB4a, 14% vs HB4a tratada, 7%). Genes diferencialmente expressos que participam da biossíntese de ácidos graxos foram encontrados exclusivamente nas células HB4a na ausência do tratamento com docetaxel (3%). As células HB4a após o tratamento com docetaxel, em relação às HB4a não tratadas, apresentaram uma maior porcentagem de genes envolvidos em adesão celular (HB4a tratada, 4% vs HB4a, 1%), organização de citoesqueleto (HB4a tratada, 10% vs HB4a, 5%), resposta imune (HB4a tratada, 9% vs HB4a, 1%) e transdução de sinal (HB4a tratada, 20% vs HB4a, 10%) (Figura 14).

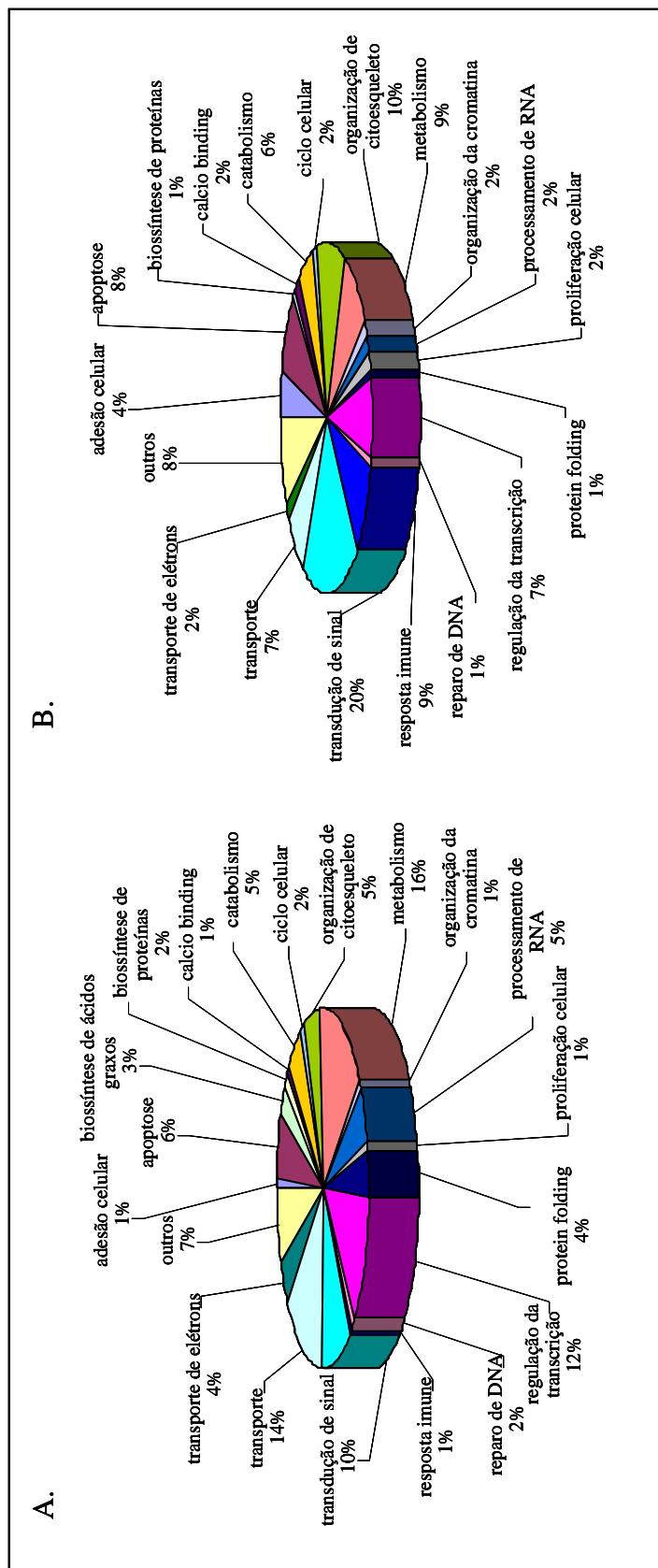


Figura 14 - Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células HB4a antes (A) e após (B) o tratamento intensivo com docetaxel quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.

A comparação dos transcritos diferencialmente expressos na linhagem celular C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, utilizando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica, revelou 294 transcritos (13,6% correspondem a ESTs) mais expressos nas células C5.2 na ausência de tratamento e 333 (18,9% são ESTs) após o tratamento com docetaxel. A classificação dos transcritos mais diferencialmente expressos entre as células C5.2 antes e após a exposição ao docetaxel, de acordo com a função biológica, mostrou que, antes do tratamento a linhagem celular C5.2 apresentou um maior número de genes que atuam em metabolismo (C5.2, 13% vs C5.2 tratada, 5%), processamento de RNA (C5.2, 6% vs C5.2 tratada, 3%), proteína “folding” (C5.2, 4% vs C5.2 tratada, 1%), transporte (C5.2, 14% vs C5.2 tratada, 6%) e ciclo celular (C5.2, 7% vs C5.2 tratada, 3%). Após o tratamento com docetaxel, as células C5.2 apresentaram uma maior porcentagem de genes envolvidos em apoptose (C5.2 tratada, 8% vs C5.2, 1%), organização de citoesqueleto (C5.2 tratada, 6% vs C5.2, 3%), transdução de sinal (C5.2 tratada, 18% vs C5.2, 13%) e proliferação celular (C5.2 tratada, 4% vs C5.2, 1%). Genes diferencialmente expressos que participam de resposta imune foram encontrados exclusivamente nas células C5.2 após o tratamento com docetaxel (3%) (Figura 15).

Considerando a abundância de tags e a anotação funcional dos transcritos encontrados diferencialmente expressos entre as células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, foram selecionados 21 genes para serem validados por PCR em tempo real (qPCR) (Tabela 2).

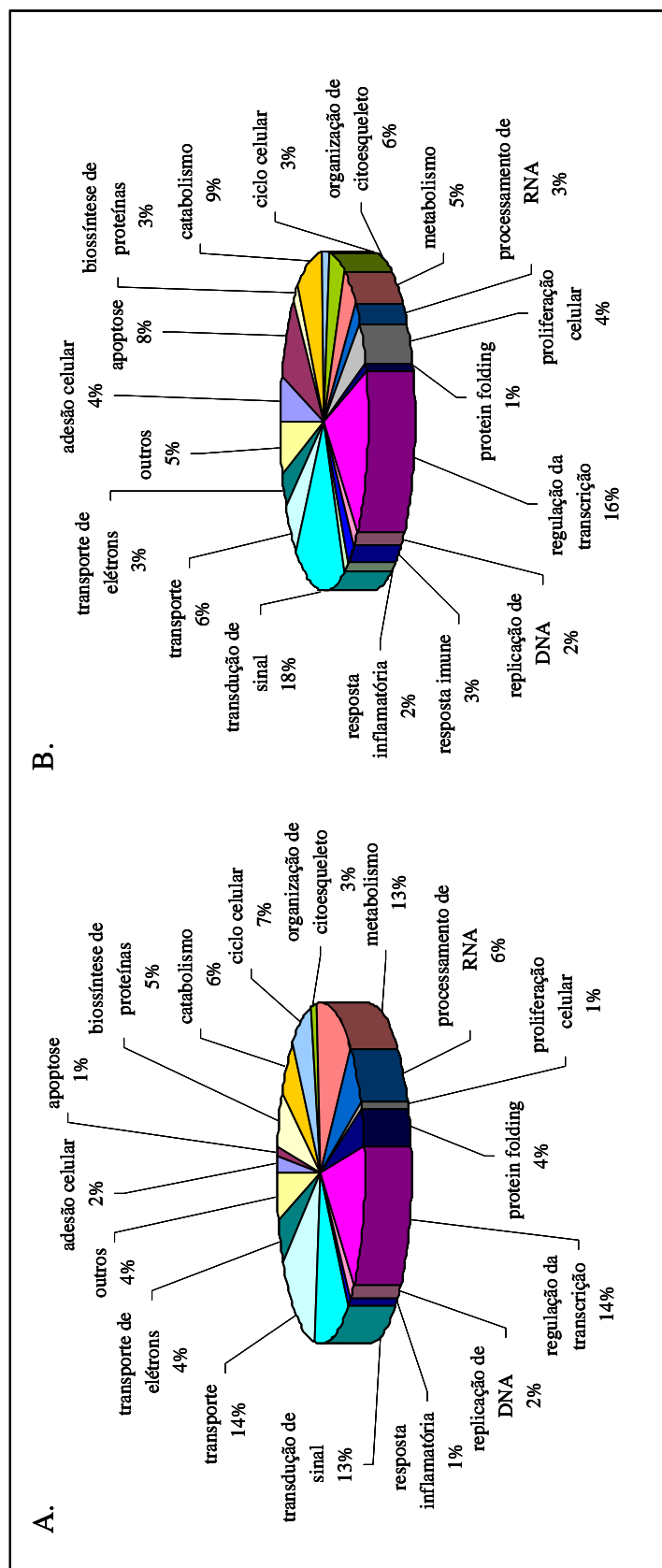


Figura 15 - Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos nas células C5.2 antes (A) e após (B) o tratamento intensivo com docetaxel quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.

Tabela 2 - Genes selecionados na comparação das bibliotecas de SAGE das linhagens celulares HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel e validados por qPCR.

Símbolo do Gene	Nome do gene	Localização cromossômica
ACTN1	Actinin, alpha 1	14q24.1-q24.2
ETFB	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	19q13.3
RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)	3q21
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	5q34
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	5q31.3-q32
TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)	15q22.1
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	8p12-p11.1
MATR3	Matrin 3	5q31.2
ATAD4 (MGC11242)	ATPase family, AAA domain containing 4	17q21.32
HDGF	Hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)	1q21-q23
CENPH	Centromere protein H	5p15.2
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	22q13.1
AES	Amino-terminal enhancer of split	19p13.3
ANP32B	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	9q22.32
FAM98A	Family with sequence similarity 98, member A	2p22.3
CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	7q31.1
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	12q22
FLJ13448	Hypothetical protein FLJ13448	2q33.1
C20orf35	Chromosome 20 open reading frame 35	20q13.12
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	8q24.3
C6orf115	Chromosome 6 open reading frame 115	6q24.1

Entre os genes selecionados para a validação, 7 (*ACTN1*, *ETFB*, *RUVBL1*, *DUSP1*, *SPARC*, *TPM1* e *SFRP1*) foram encontrados com expressão reduzida nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel. Apenas um destes genes (*ETFB*) manteve o padrão de expressão diferencial entre as linhagens celulares HB4a e C5.2 após o tratamento com docetaxel, considerando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica; os outros 6 passaram a ter uma expressão semelhante nas células HB4a e C5.2 tratadas com docetaxel. Treze genes (*MATR3*, *MGC11242*, *HDGF*, *CENPH*, *LGALS1*, *AES*, *ANP32B*, *FAM98A*, *CAV1*, *BTG1*, *FLJ13448*, *C20orf35* e *NDRG1*) escolhidos para serem validados mostraram expressão aumentada nas células C5.2 comparadas às células HB4a, antes do tratamento com docetaxel. Considerando o corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica, apenas dois destes genes (*MATR3* e *MGC11242*) foram encontrados diferencialmente expressos na linhagem celular C5.2 em relação às células HB4a, após receberem o tratamento com docetaxel; nos outros dez genes, o número de tags observado nas bibliotecas das células HB4a e C5.2 na presença do tratamento com docetaxel foi mais próximo. O gene *NDRG1*, apesar de apresentar uma expressão apenas duas vezes maior nas células C5.2 em relação às HB4a, foi incluído na validação por ser um gene estudado por nosso grupo, e que está envolvido na via sinalização do gene *ERBB2*. O último gene selecionado para a validação foi o *C6orf115*, que possui expressão aumentada nas células C5.2 comparadas às HB4a somente após o tratamento com docetaxel (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de tags, considerando a tag principal, dos genes selecionados para a validação por qPCR, que foram identificados na comparação das bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel.

Gene	HB4	C5.2	HB4+Doc	C5.2+Doc
ACTN1	23	1,02	11,66	11
ETFB	18	0	19,08	2
RUVBL1	15	0	2,12	1
DUSP1	12	1,02	13,78	4
SPARC	141	17,34	22,26	18
TPM1	8	0	4,24	4
SFRP1	8	1,02	0	1
MATR3	0	230,52	0	451
ATAD4 (MGC11242)	0	16,32	0	7
HDGF	1	14,28	16,96	6
CENPH	2	25,50	4,24	7
LGALS1	2	23,46	6,36	8
AES	1	10,20	7,42	1
ANP32B	2	18,36	8,48	8
FAM98A	1	9,18	1,06	2
CAV1	0	8,16	2,12	0
BTG1	2	16,32	10,6	9
FLJ13448	1	8,16	24,38	17
C20orf35	0	7,14	9,54	12
NDRG1	2	4,08	6,36	4
C6orf115	5	8,16	1,06	20

Doc – docetaxel.

Inicialmente, cinco genes (*MATR3*, *MGC11242*, *HDGF*, *ANP32B*, *CENPH*) com expressão aumentada e quatro (*ETFB*, *SPARC*, *RUVBL1* e *SFRP1*) com expressão reduzida na linhagem celular C5.2 comparada às células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel, foram validados por RT-PCR semi-quantitativa. A linhagem celular C3.6, que possui expressão moderada do gene *ERBB2*, foi incluída nesta análise. O padrão de expressão gênica observado nos nove genes analisados por RT-PCR foi consistente com o observado pela técnica de SAGE (Figura 16).

Visando uma melhor compreensão do efeito do docetaxel na expressão dos genes selecionados para a validação, as linhagens celulares HB4a e C5.2 foram tratadas com duas concentrações de docetaxel, 20 e 100nM, por 24 horas, e o RNA total foi extraído. Os cDNAs sintetizados a partir dos RNAs totais obtidos deste tratamento por 24 horas com docetaxel foram incluídos nas análises de qPCR.

O gene *GAPDH* foi utilizado como gene referência em todas as análises de qPCR, conforme descrito em Material e Métodos. As células HB4a não tratadas foram usadas como amostra referência nas análises comparativas com as células C5.2 na ausência de tratamento, ou com as células HB4a submetidas ao tratamento com docetaxel. As células C5.2 não tratadas serviram como amostra referência na comparação com as células C5.2 tratadas com docetaxel.

Os genes *ACTN1*, *TPM1*, *SPARC* e *RUVBL1* apresentaram um perfil de expressão gênica semelhante nas linhagens de células HB4a e C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, pela técnica de SAGE, que foi confirmado por qPCR (Tabela 3; Figuras 17-20).

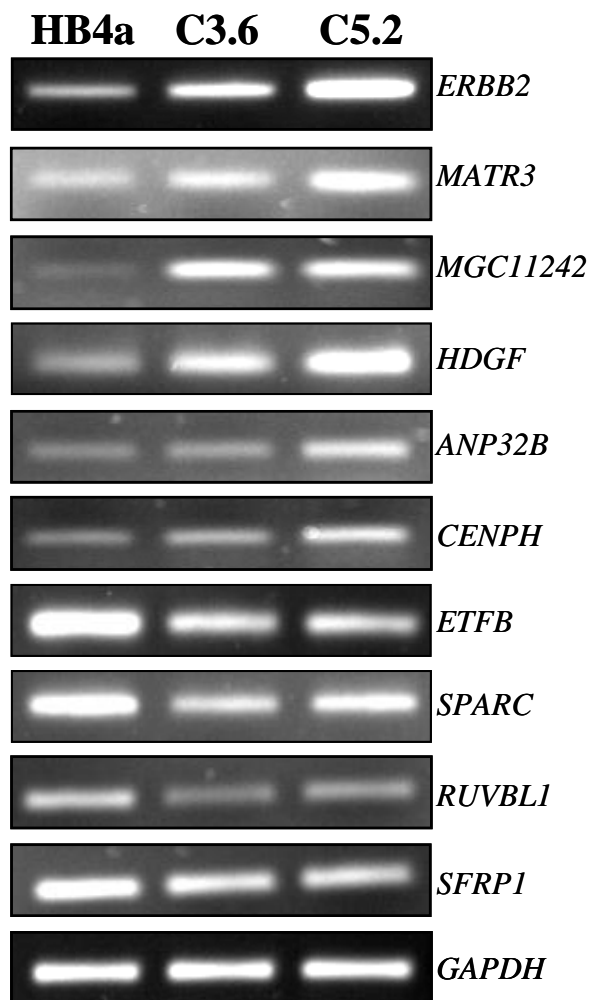
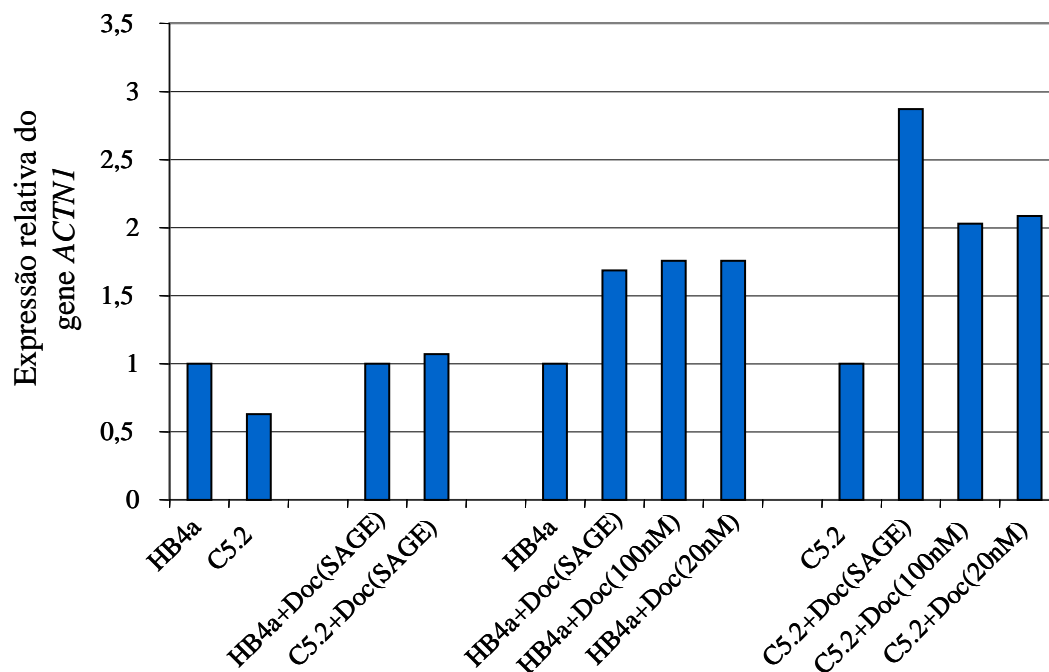
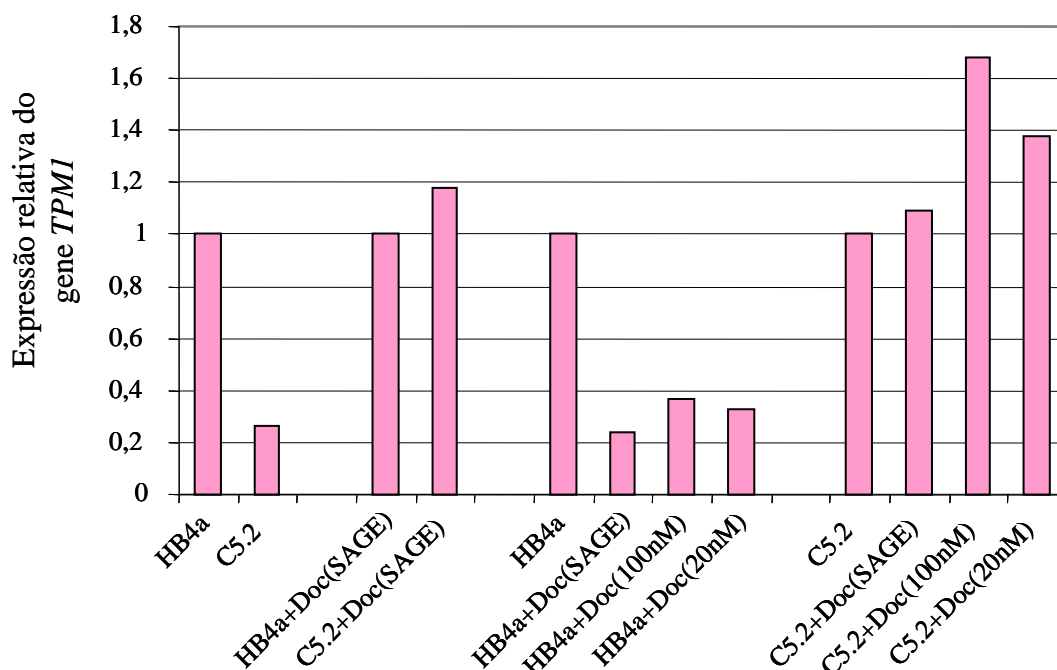


Figura 16 – Análise da expressão de 9 genes encontrados diferencialmente expressos na comparação das bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel, por RT-PCR.



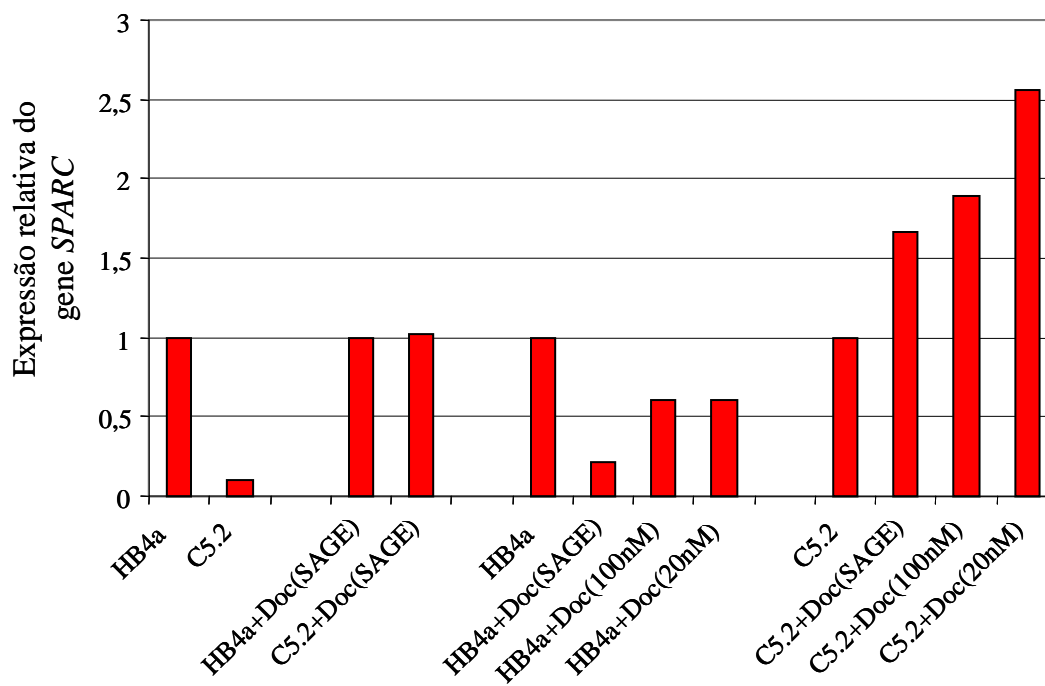
Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *ACTN1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 17 – Análise da expressão relativa do gene *ACTN1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



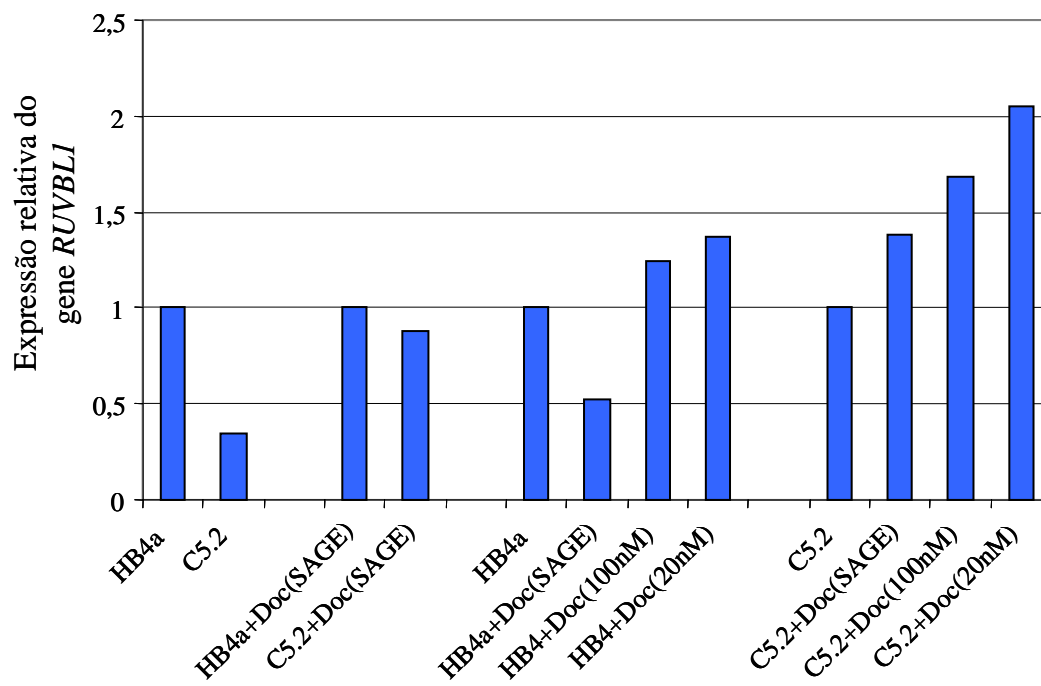
Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *TPM1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 18 – Análise da expressão relativa do gene *TPM1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *SPARC* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 19 – Análise da expressão relativa do gene *SPARC* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *RUVBL1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 20 – Análise da expressão relativa do gene *RUVBL1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

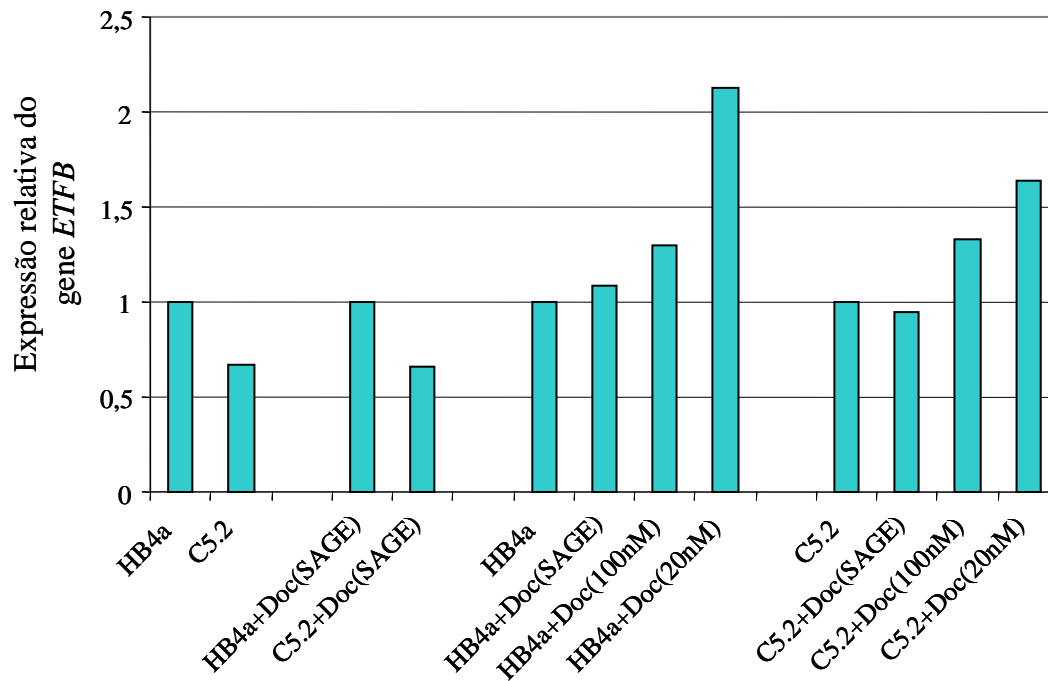
Na ausência do tratamento, a análise da expressão relativa dos genes *ACTN1*, *TPM1*, *SPARC* e *RUVBL1*, por qPCR, mostrou uma redução de 40, 74, 90 e 66%, respectivamente, nas células C5.2 comparadas às células HB4a. Após o tratamento intensivo com docetaxel, as duas linhagens de células passaram a ter uma expressão similar destes quatro genes. Interessantemente, a comparação das células HB4a antes e após exposição intensa ao docetaxel mostrou uma redução na expressão relativa dos genes *TPM1*, *SPARC* e *RUVBL1*, nas células tratadas, que foi equivalente a observada nas células C5.2 comparadas às células HB4a não tratadas. Embora pela análise de SAGE tenha sido observado um decréscimo de 2 vezes na expressão do gene *ACTN1* nas células HB4a submetidas ao tratamento intensivo com docetaxel, em relação a mesma linhagem celular não tratada, essa alteração na expressão não foi encontrada na análise por qPCR. Confirmando os dados de SAGE, a comparação das células C5.2 antes e após o tratamento intensivo com docetaxel mostrou aumento significativo apenas na expressão do gene *ACTN1* nas células tratadas, na análise por qPCR.

O tratamento das células HB4a com 20 e 100nM de docetaxel por 24 horas manteve o padrão de expressão dos genes *ACTN1*, *TPM1* e *SPARC*, observado nestas células após o tratamento intensivo com docetaxel, comparadas à mesma linhagem celular não tratada. O gene *RUVBL1* não teve sua expressão alterada de forma significativa após o tratamento das células HB4a com docetaxel por 24 horas, em comparação com as mesmas células não tratadas. Em relação às respostas observadas pela linhagem celular C5.2 ao tratamento com 20 e 100nM com docetaxel, por 24 horas, foi encontrado um aumento na expressão dos genes: *ACTN1*, de 2 vezes em ambas as concentrações da droga, *TPM1*, que foi maior com a dose de 100nM (1,7

vezes), e *SPARC* e *RUVBL1*, principalmente após a administração de 20nM de docetaxel (2,6 e 2 vezes, respectivamente) (Figuras 17-20).

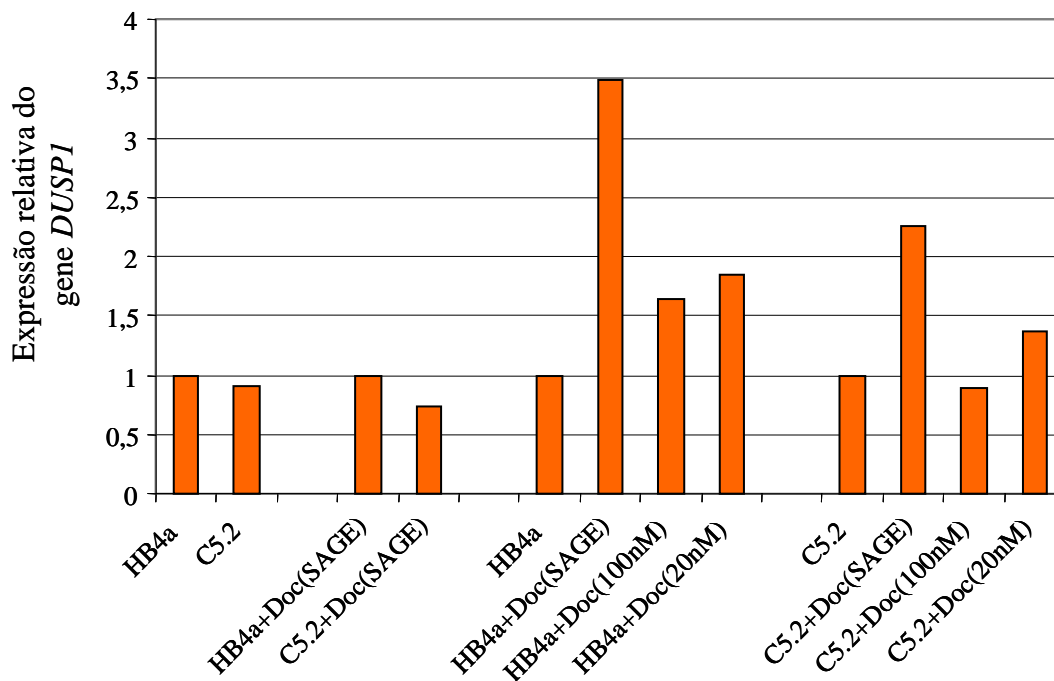
A expressão diferencial do gene *ETFB*, entre as linhagens celulares HB4a e C5.2, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, identificada pela técnica de SAGE, foi confirmada por qPCR (Tabela 3; Figura 21). Uma redução de 34% na expressão de *ETFB* foi observada nas células C5.2 em relação às células HB4a, tanto na ausência quanto na presença do tratamento com docetaxel. Comparando-se a expressão do gene *ETFB* nas células HB4a tratadas com docetaxel com as não tratadas, observou-se alteração de expressão apenas na tratada com 20nM de docetaxel por 24 horas, um aumento de 2,1 vezes. O mesmo ocorreu quando se comparou as células C5.2 antes e após o tratamento com docetaxel, entretanto o aumento observado nas células C5.2 tratadas com 20nM, por 24 horas, foi um pouco menor, igual a 1,6 vezes (Figura 21).

A análise da expressão relativa de *DUSP1* por qPCR, diferentemente do encontrado no SAGE, mostrou apenas uma tendência a redução de expressão de *DUSP1* nas células C5.2 comparadas às HB4a, com um decréscimo de 10% na expressão deste gene (Tabela 3; Figura 22). Após o tratamento com docetaxel, observou-se que a expressão de *DUSP1* nas células C5.2 foi 26% menor do que a das células HB4a, padrão semelhante ao obtido pelo SAGE. Na comparação das células HB4a após exposição intensa ao docetaxel, com as mesmas células sem tratamento, foi encontrado um aumento de 3,5 vezes na expressão do gene *DUSP1*, o que difere do observado no SAGE, em que não houve variação de expressão deste gene.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *ETFB* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 21 – Análise da expressão relativa do gene *ETFB* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

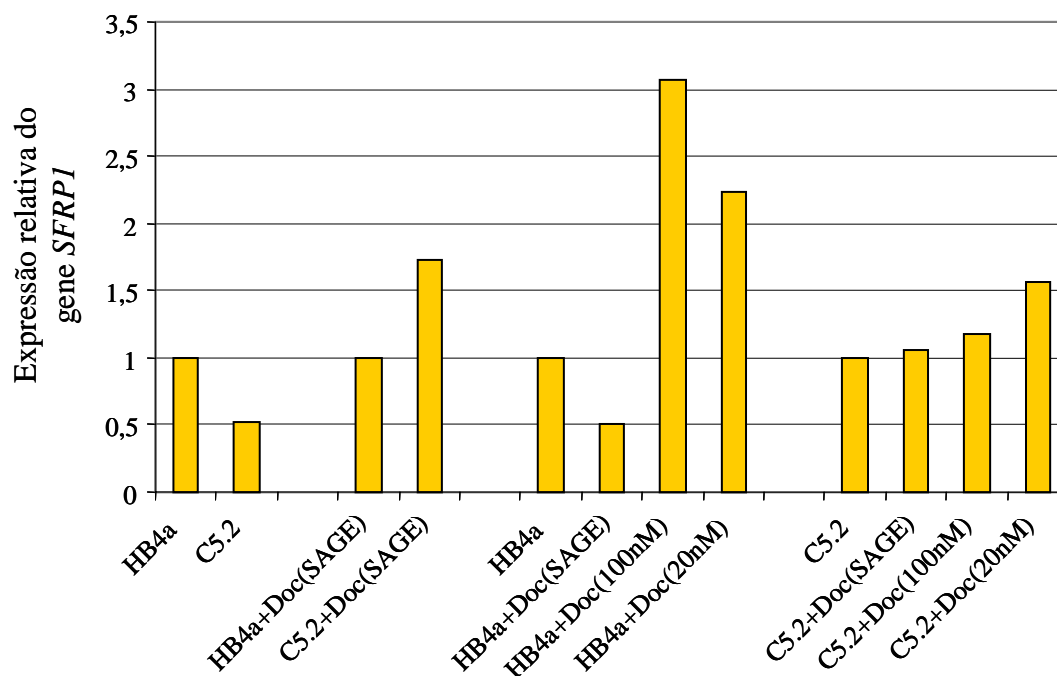


Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *DUSP1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 22 – Análise da expressão relativa do gene *DUSP1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

As células C5.2 submetidas ao tratamento intensivo com docetaxel apresentaram um aumento de 2,2 vezes na expressão do gene *DUSP1* comparadas às C5.2 não tratadas, que foi coerente com o padrão de expressão gênica obtido pela técnica de SAGE (Tabela 3; Figura 22). As células HB4a submetidas ao tratamento com 20 e 100nM de docetaxel apresentaram um aumento de aproximadamente 1,7 vezes na expressão de *DUSP1*, comparadas às mesmas células não tratadas. A comparação da linhagem celular C5.2 tratada com docetaxel por 24 horas com as células C5.2 na ausência de tratamento, não revelou variação significativa na expressão de *DUSP1* (Figura 22).

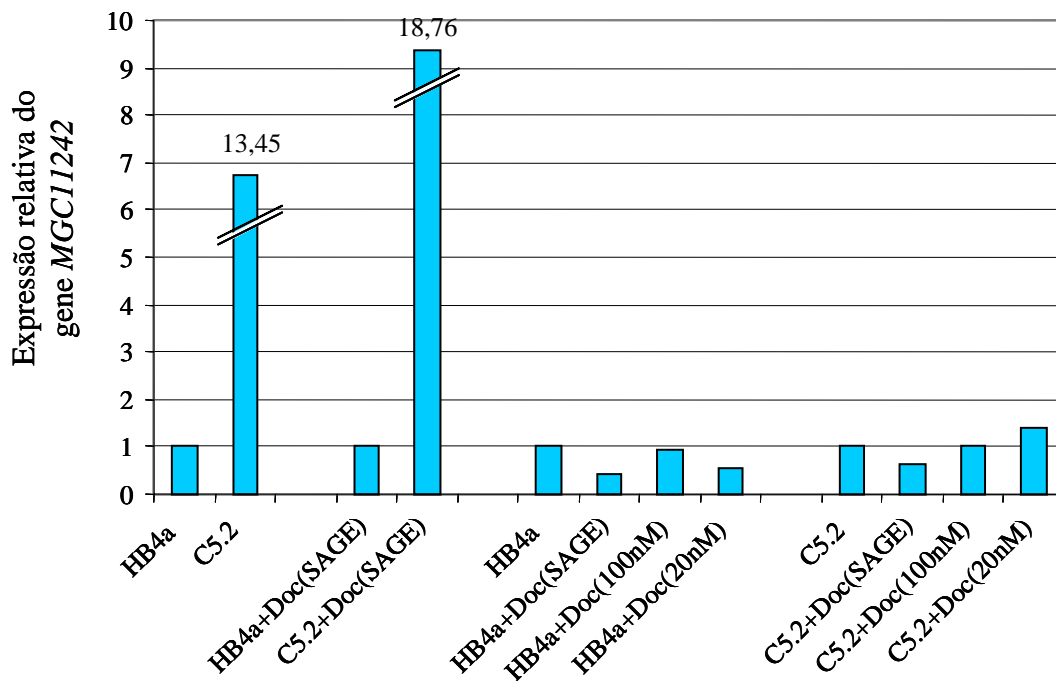
Na análise da expressão do gene *SFRP1*, por qPCR, foi encontrada uma redução de 50% na expressão deste gene nas células C5.2 quando comparadas às células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel. Após o tratamento com docetaxel, observou-se um aumento de 1,7 vezes na expressão de *SFRP1* nas células C5.2 em relação às HB4a. As células HB4a submetidas ao tratamento intensivo com docetaxel apresentaram a mesma redução (de 50%) na expressão de *SFRP1* do que as células C5.2 não tratadas, quando comparadas com as células HB4a sem tratamento. Por outro lado, as células HB4a tratadas com 20 e 100nM de docetaxel tiveram um aumento na expressão do gene *SFRP1* de 2,2 e 3 vezes, respectivamente. A linhagem celular C5.2 não sofreu alteração significativa na expressão do gene *SFRP1* após o tratamento com docetaxel. O padrão de expressão do gene *SFRP1* obtido por qPCR foi consistente com o encontrado pela técnica de SAGE (Tabela 3; Figura 23).



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *SFRP1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

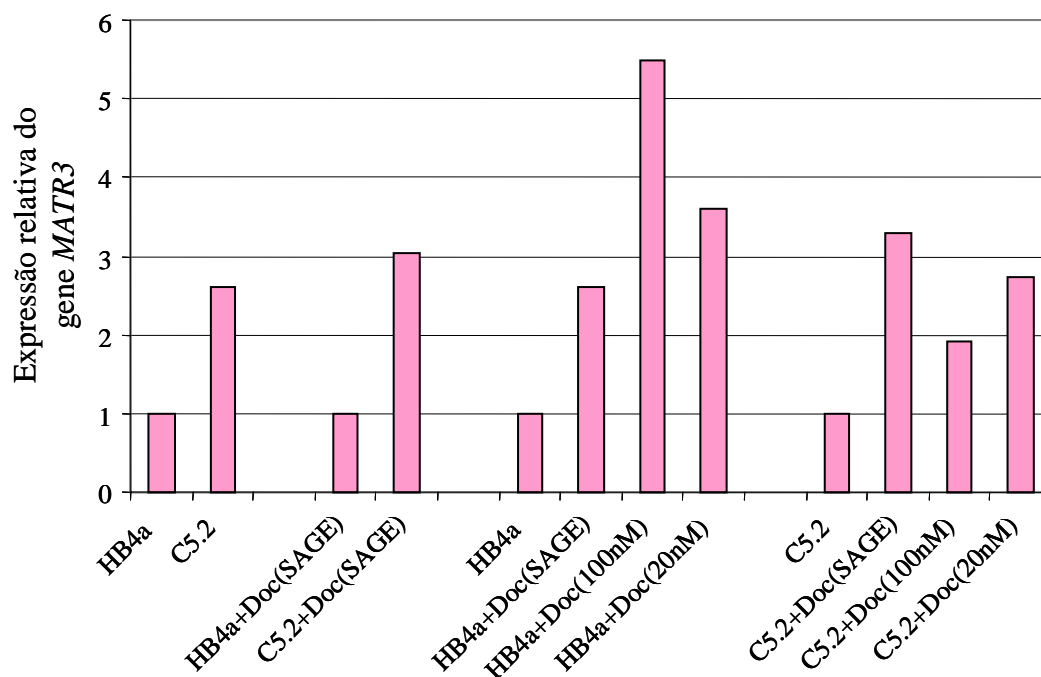
Figura 23 – Análise da expressão relativa do gene *SFRP1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

Os genes *MGC11242* (*ATAD4*) e *MATR3* foram encontrados mais expressos nas células C5.2 do que nas células HB4a tanto na ausência quanto na presença do tratamento intensivo com docetaxel, pelas técnicas de SAGE e qPCR. (Tabela 3; Figuras 24 e 25). Na ausência de tratamento, foi observado um aumento de 13,5 vezes na expressão do gene *MGC11242* e, após o tratamento com docetaxel, esse aumento foi de 18,8 vezes nas células C5.2 em relação às células HB4a. Para o gene *MATR3* foi encontrado um aumento de 2,6 e 3 vezes nas células C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, respectivamente, comparadas às células HB4a. Após o tratamento das células HB4a com docetaxel, os genes *MGC11242* e *MATR3* apresentaram padrões de expressão diferentes na análise por qPCR. Foi encontrada uma redução na expressão do gene *MGC11242* nas células HB4a tratadas intensivamente e com 20nM de docetaxel, de 58 e 47%, respectivamente, em relação às células HB4a não tratadas. Para os transcritos do gene *MATR3*, observou-se um aumento da expressão de 2,6 vezes nas células HB4a tratadas intensivamente com docetaxel, e de 3,6 e 5,5 vezes nas HB4a tratadas com 20 e 100nM de docetaxel, respectivamente, comparando-as com a mesma linhagem na ausência de tratamento. Esta variação na expressão de *MATR3* nas células HB4a após exposição intensa ao docetaxel não foi observada pela técnica de SAGE. A comparação das células C5.2 antes e após o tratamento com docetaxel não mostrou alterações significativas na expressão de *MGC11242*, enquanto na análise de *MATR3* foi encontrado aumento de expressão de 3,3, 2,7 e 1,9 vezes nas células tratadas intensivamente, com 20nM e 100nM de docetaxel, respectivamente, comparadas às células C5.2 não tratadas (Figuras 24 e 25).



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *MGC11242* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 24 – Análise da expressão relativa do gene *MGC11242* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

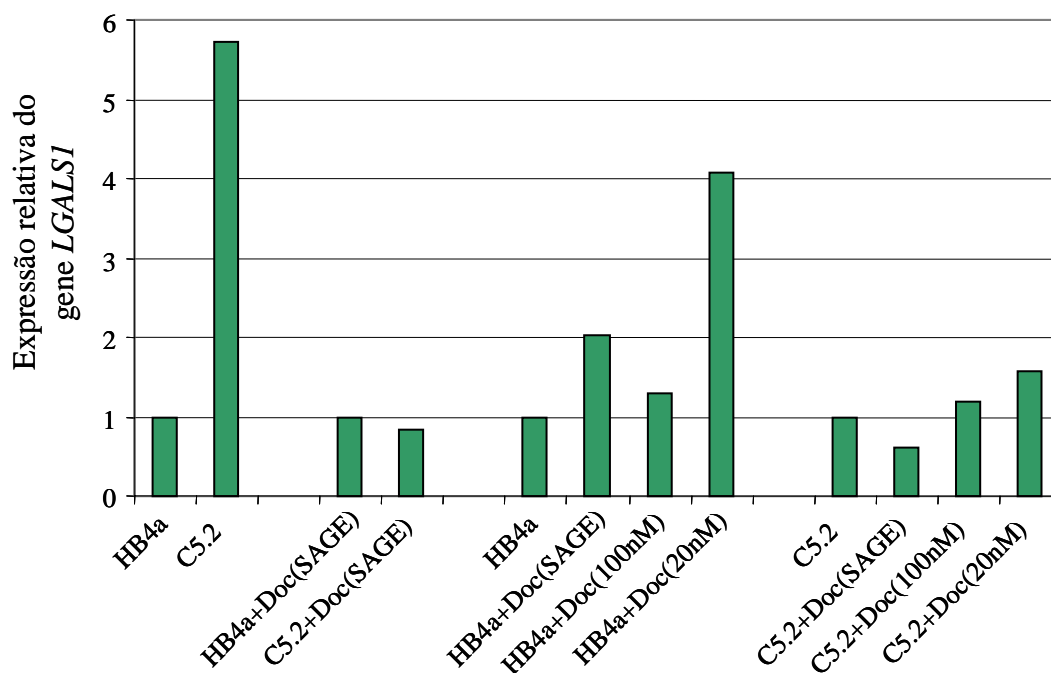


Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *MATR3* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 25 – Análise da expressão relativa do gene *MATR3* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

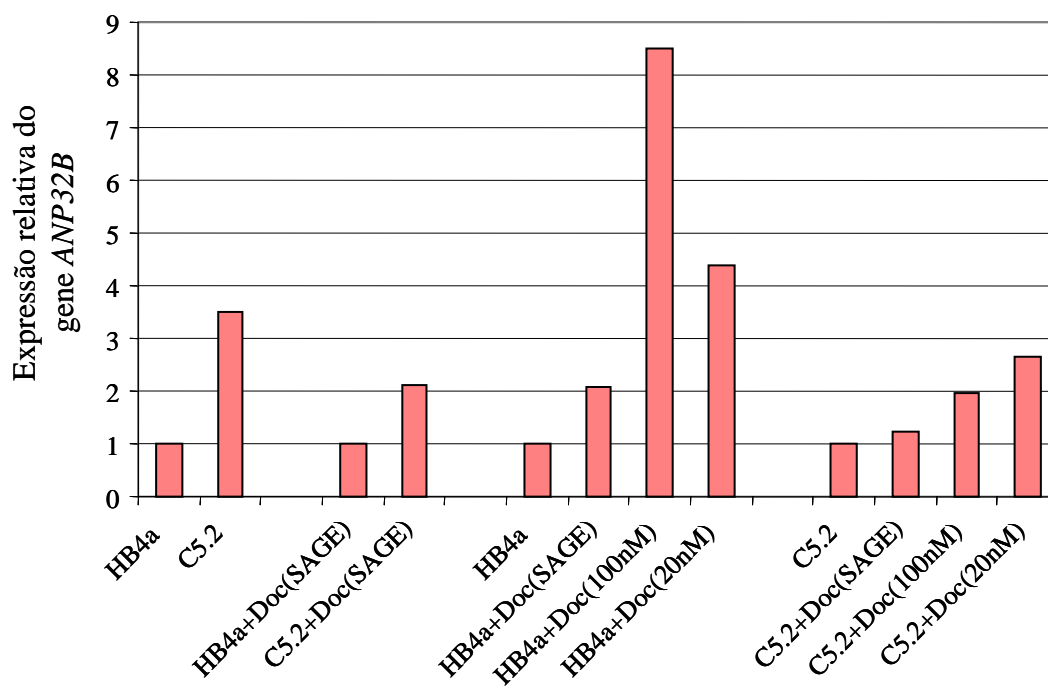
Os genes *LGALS1*, *ANP32B* e *BTG1* foram inicialmente selecionados por apresentarem um aumento de expressão nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência de tratamento, nas bibliotecas de SAGE e, além disso, por estarem envolvidos no processo de apoptose, de acordo com a anotação funcional realizada. A análise destes genes por qPCR mostrou um aumento de 5,7, 3,5 e 1,6 vezes na expressão dos genes *LGALS1*, *ANP32B* e *BTG1*, respectivamente, nas células C5.2 em relação às HB4a. Embora os dados de SAGE não tenham revelado diferenças na expressão destes genes na comparação das linhagens celulares HB4a e C5.2 após tratamento com docetaxel (Tabela 3), foi encontrado, por qPCR, um aumento de 2,1 vezes na expressão de *ANP32B* nas células C5.2 tratadas. De acordo com os resultados obtidos pelas técnicas de SAGE e qPCR, as células HB4 tratadas intensivamente com docetaxel apresentaram aumento de expressão de 2 vezes de *LGALS1* e *ANP32B*, e de 3 vezes de *BTG1*, em relação às células HB4a não tratadas. A comparação das bibliotecas de SAGE das células C5.2 antes e após exposição intensa ao docetaxel demonstrou uma redução na expressão de *LGALS1*, *ANP32B* e *BTG1* nas células tratadas, no entanto, na análise por qPCR só foi observada diminuição na expressão do gene *LGALS1*, que foi de 40% (Figuras 26-28). Após o tratamento das células HB4a com docetaxel por 24 horas, foi encontrado aumento na expressão de *LGALS1* (4 vezes), após a administração de 20nM da droga, de *BTG1* (1,5 vezes), com a dose de 100nM, e de *ANP32B* com 20 e 100nM de docetaxel, que foi de 4,4 e 8,5 vezes, respectivamente, comparadas às células HB4a, na ausência de tratamento. Nas células C5.2 submetidas a este mesmo tratamento com docetaxel por 24 horas, comparadas às não tratadas, foi observado um aumento de 1,6 vezes na expressão de *LGALS1*, após a administração de 20nM da droga, e de 2,7 e 2 vezes na

expressão de *ANP32B*, com as doses de 20 e 100nM de docetaxel, respectivamente (Figuras 26-28).



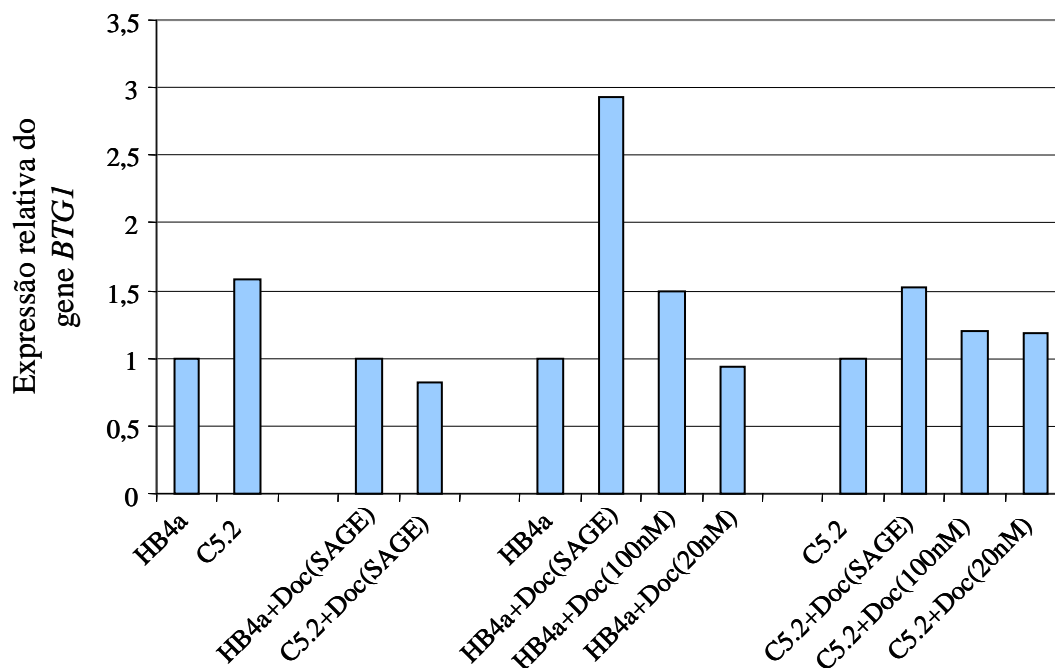
Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *LGALS1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 26 – Análise da expressão relativa do gene *LGALS1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *ANP32B* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 27 – Análise da expressão relativa do gene *ANP32B* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

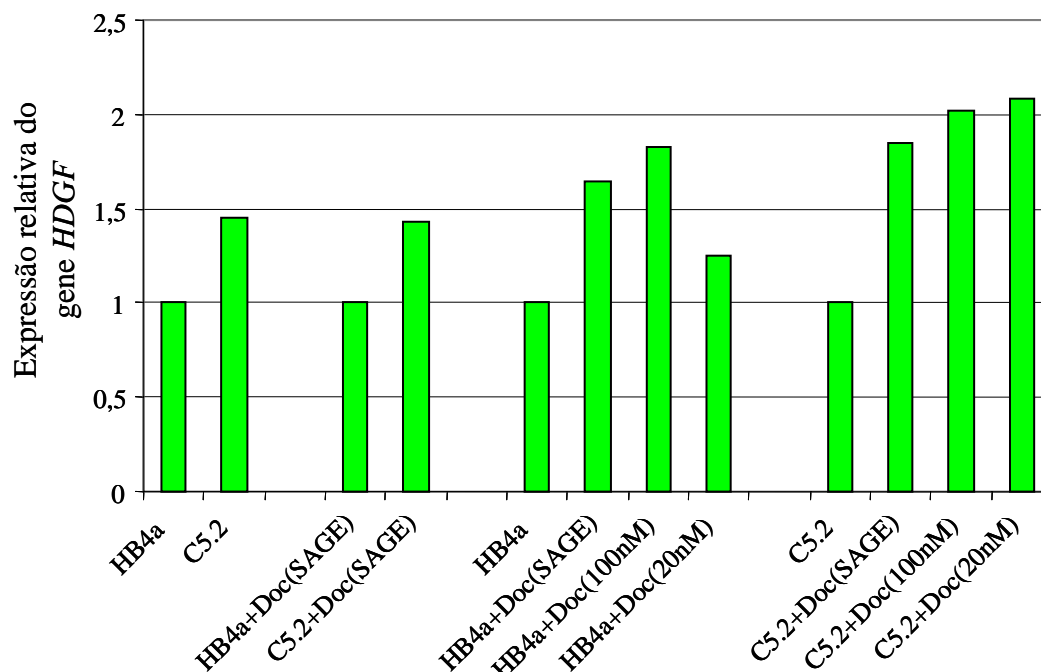


Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *BTG1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 28 – Análise da expressão relativa do gene *BTG1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

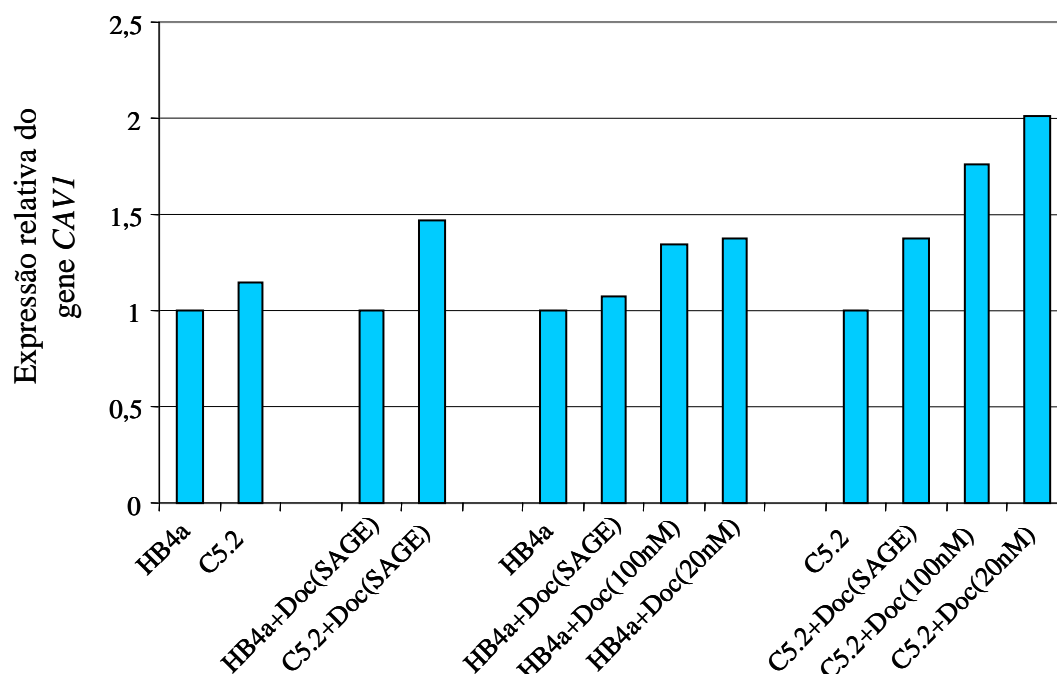
Os genes *HDGF* e *CAVI* apresentaram pouca variação de expressão nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, pela técnica de qPCR, ao contrário do que foi observado na análise de SAGE (Tabela 3; Figuras 29 e 30). Estes genes foram encontrados mais expressos nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência de tratamento, pela técnica de SAGE. Os ensaios de qPCR mostraram um pequeno aumento de 1,4 vezes na expressão do gene *HDGF* nas células C5.2 em relação às células HB4a não tratadas. A expressão do gene *CAVI* foi similar nas células HB4a e C5.2 na ausência de tratamento. Após o tratamento intensivo das células com docetaxel, foi encontrado um aumento de 1,4 vezes na expressão dos genes *HDGF* e *CAVI*, nas células C5.2 comparadas às HB4a, por qPCR, embora o mesmo não tenha sido visto nos dados obtidos no SAGE. A comparação da expressão de *HDGF* e *CAVI* nas células HB4a, antes e após exposição intensa ao docetaxel, revelou um aumento de expressão de *HDGF*, de 1,6 vezes, nesta linhagem de células após o tratamento, por qPCR, confirmando o padrão de expressão gênica obtido no SAGE. Nas células C5.2, contrariando os resultados de SAGE, foi encontrado, por qPCR, aumento na expressão de *HDGF* (1,8 vezes) e *CAVI* (1,4 vezes) após o tratamento intensivo com docetaxel, em relação às mesmas células não tratadas. Na análise por qPCR, as maiores alterações na expressão de *HDGF* e *CAVI* foram vistas após o tratamento das linhagens de células HB4a e C5.2 com 20 e 100nM de docetaxel, por 24 horas. As células HB4a tratadas com 100nM de docetaxel apresentaram um aumento de 1,8 vezes na expressão de *HDGF*, em relação às células HB4a na ausência de tratamento. As células C5.2 em resposta a administração de 20 e 100nM de docetaxel mostraram um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão dos genes *HDGF* e *CAVI*, comparadas às

células C5.2 não tratadas (Figuras 29 e 30).



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *HDGF* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 29 – Análise da expressão relativa do gene *HDGF* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

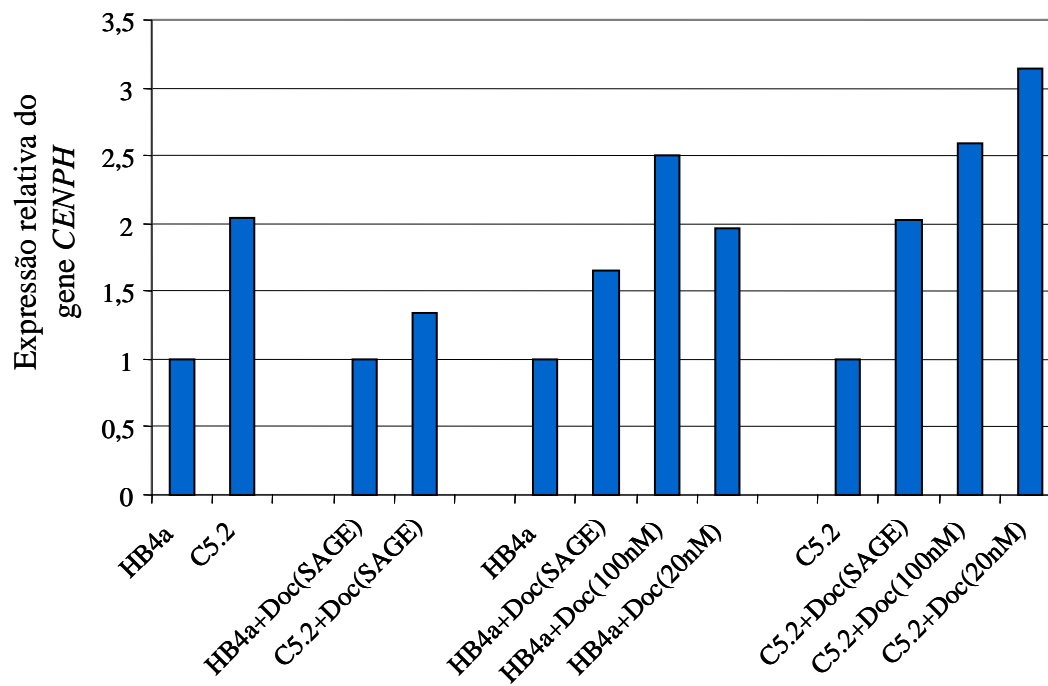


Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *CAVI* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 30 – Análise da expressão relativa do gene *CAVI* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real

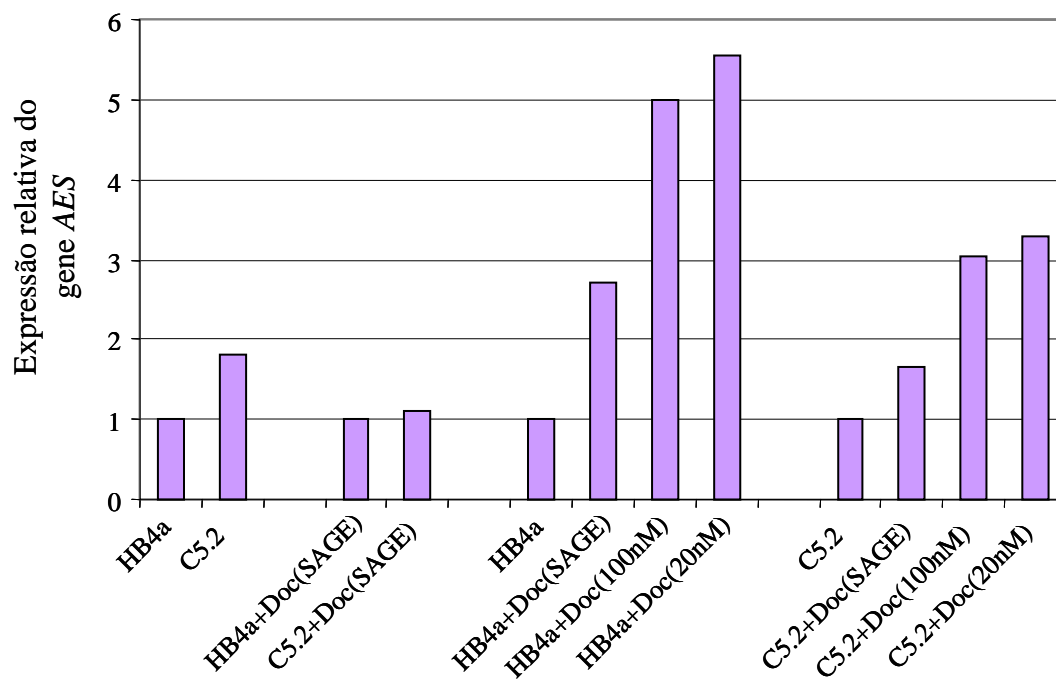
A análise da expressão dos genes *CENPH* e *AES* por qPCR mostraram um aumento de 2 e 1,8 vezes, respectivamente, na expressão destes genes nas células C5.2 em relação às células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel, corroborando o padrão de expressão gênica obtido pelo SAGE. A comparação das células HB4a e C5.2 após o tratamento com docetaxel não revelou alterações significativas na expressão de *CENPH* e *AES*, embora os dados obtidos no SAGE indiquem uma redução na expressão do gene *AES* nas células C5.2 tratadas. Nas células HB4a tratadas com docetaxel, em relação às células HB4a não tratadas, foi observado aumento de 1,7, 2 e 2,5 vezes na expressão de *CENPH*, e de 2,7, 5,5 e 5 vezes na expressão de *AES*, após exposição intensa, 20 e 100nM de docetaxel, respectivamente. Ao contrário do observado nas bibliotecas de SAGE, as células C5.2 tratadas intensivamente com docetaxel apresentaram aumento de expressão dos genes *CENPH* (2 vezes) e *AES* (1,7 vezes), comparadas às mesmas células não tratadas, por qPCR (Tabela 3; Figuras 31 e 32). Após o tratamento das células C5.2 com 20 e 100nM de docetaxel por 24 horas, foi encontrado um aumento de 3,1 e 2,6 vezes, respectivamente, na expressão de *CENPH*, e de 3 vezes na expressão do gene *AES*, após a administração de ambas as concentrações de docetaxel (Figuras 31 e 32).

Os genes *C20orf35*, *FLJ13448* e *FAM98A* codificam proteínas hipotéticas e foram identificados pela expressão aumentada nas células C5.2 comparadas às células HB4a, observada nos resultados de SAGE. A análise por qPCR mostrou um aumento de expressão significativo, de 2,2 vezes, nos genes *C20orf35* e *FAM98A*, e discreto, de 1,2 vezes, no gene *FLJ13448*, confirmando o padrão de expressão gênica obtido no SAGE (Tabela 3; Figuras 33-35).



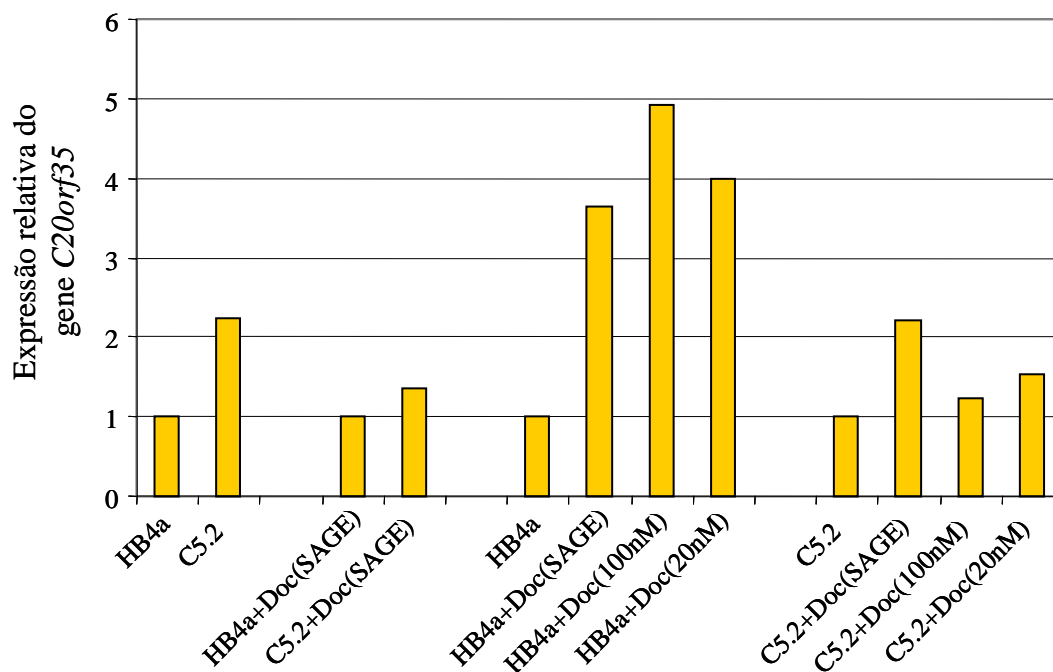
Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *CENPH* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 31 – Análise da expressão relativa do gene *CENPH* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



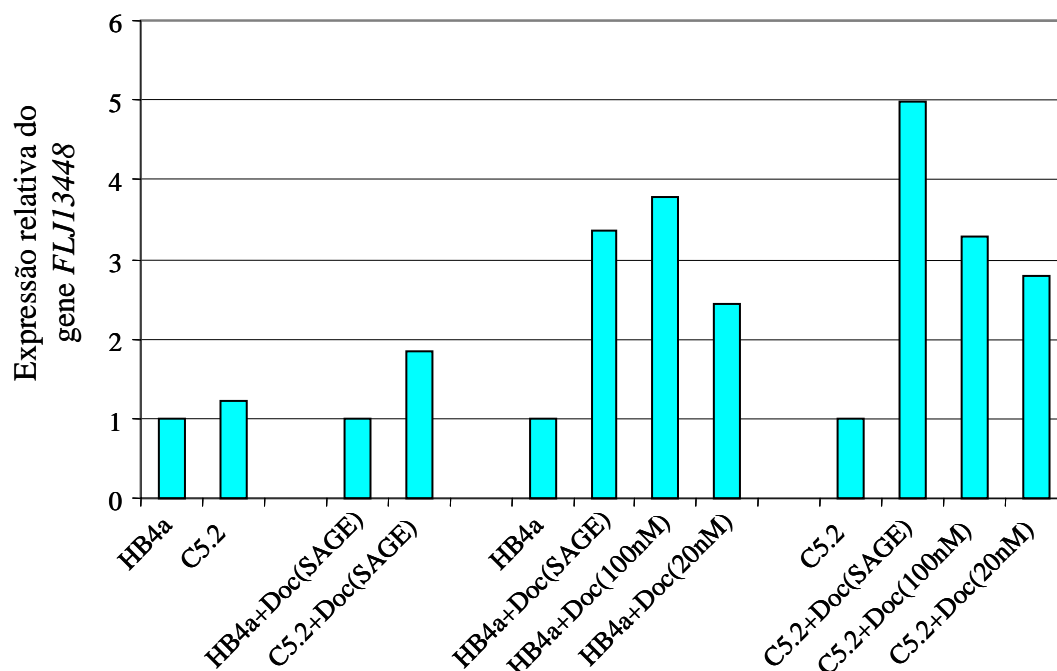
Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de AES nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 32 – Análise da expressão relativa do gene *AES* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



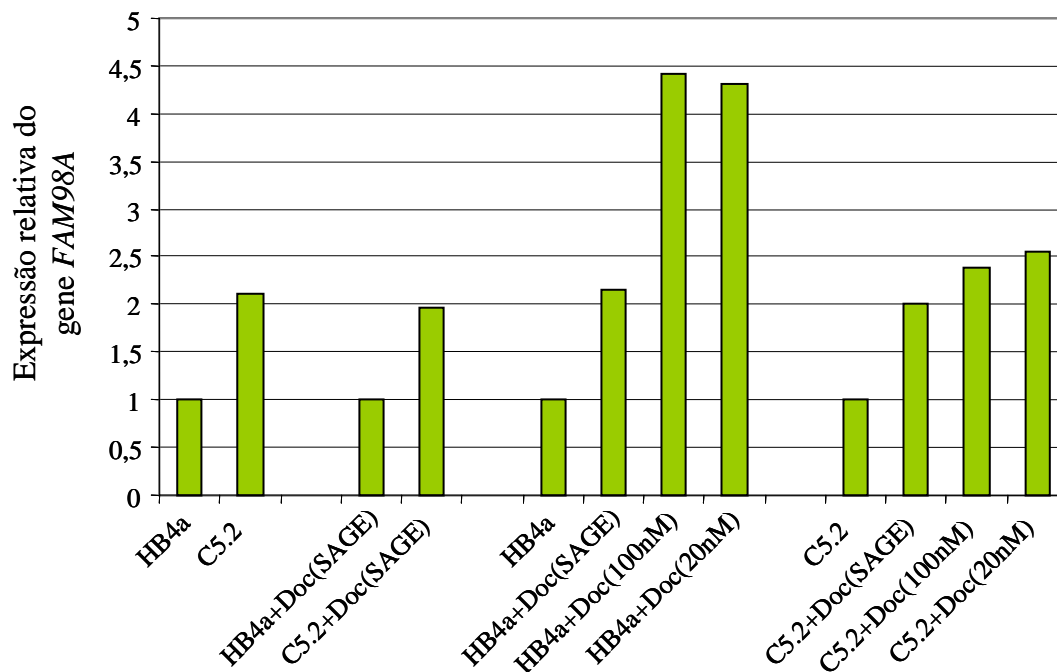
Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *C20orf35* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 33 – Análise da expressão relativa do gene *C20orf35* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *FLJ13448* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 34 – Análise da expressão relativa do gene *FLJ13448* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *FAM98A* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

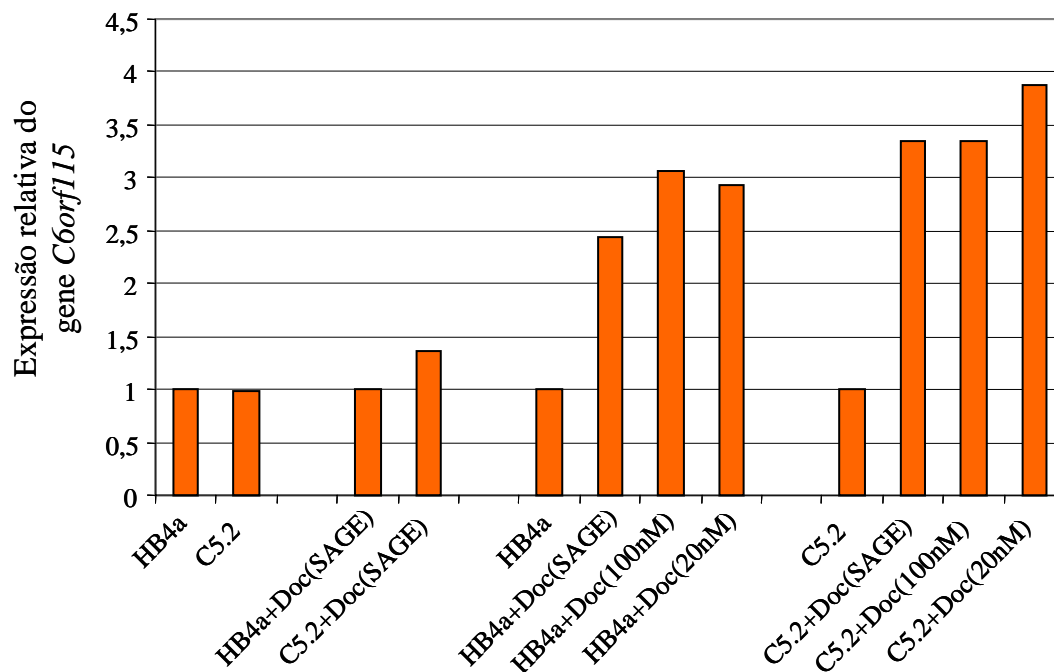
Figura 35 – Análise da expressão relativa do gene *FAM98A* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

Após o tratamento das células, HB4a e C5.2, com doses crescentes de docetaxel, foi encontrado um aumento de 1,9 vezes na expressão relativa dos genes *FLJ13448* e *FAM98A* nas células C5.2 em relação às células HB4a tratadas, não observado nos resultados de SAGE para o gene *FLJ13448*. A comparação das bibliotecas de SAGE da linhagem celular HB4a antes e após exposição intensa ao docetaxel revelou um aumento na expressão dos genes *C20orf35* e *FLJ13448* nas células HB4a tratadas. Na análise por qPCR foi observado aumento de expressão dos três genes, *C20orf35* (3,6 vezes), *FLJ13448* (3,4 vezes) e *FAM98A* (2,1 vezes) nas células HB4a tratadas intensivamente com docetaxel, em relação às mesmas células não tratadas, corroborando parcialmente os dados de SAGE. O mesmo ocorreu nas células C5.2 tratadas intensivamente com docetaxel, comparadas às células C5.2 não tratadas. Os ensaios de qPCR mostraram o aumento de 2,2, 5 e 2 vezes na expressão dos genes *C20orf35*, *FLJ13448* e *FAM98A*, respectivamente, nas células C5.2 tratadas, embora uma elevação de expressão nessas células tenha sido observado no SAGE somente para os genes *C20orf35* e *FLJ13448* (Tabela 3; Figuras 33-35). O tratamento das células HB4a com 20 e 100nM de docetaxel por 24 horas levou ao aumento significativo da expressão dos genes *C20orf35* (4 e 4,9 vezes), *FLJ13448* (2,4 e 3,8 vezes) e *FAM98A* (4,3 e 4,4 vezes), quando comparadas às células HB4a na ausência de tratamento. Nas células C5.2, o tratamento com 20 e 100nM de docetaxel por 24 horas, provocou um aumento de aproximadamente 3 e 2,5 vezes na expressão dos genes *FLJ13448* e *FAM98A*, respectivamente (Figuras 33-35).

A expressão diferencial do gene *C6orf115*, foi encontrada na comparação das bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2 tratadas com docetaxel. A análise da expressão do gene *C6orf115* por qPCR confirmou o padrão de expressão observado

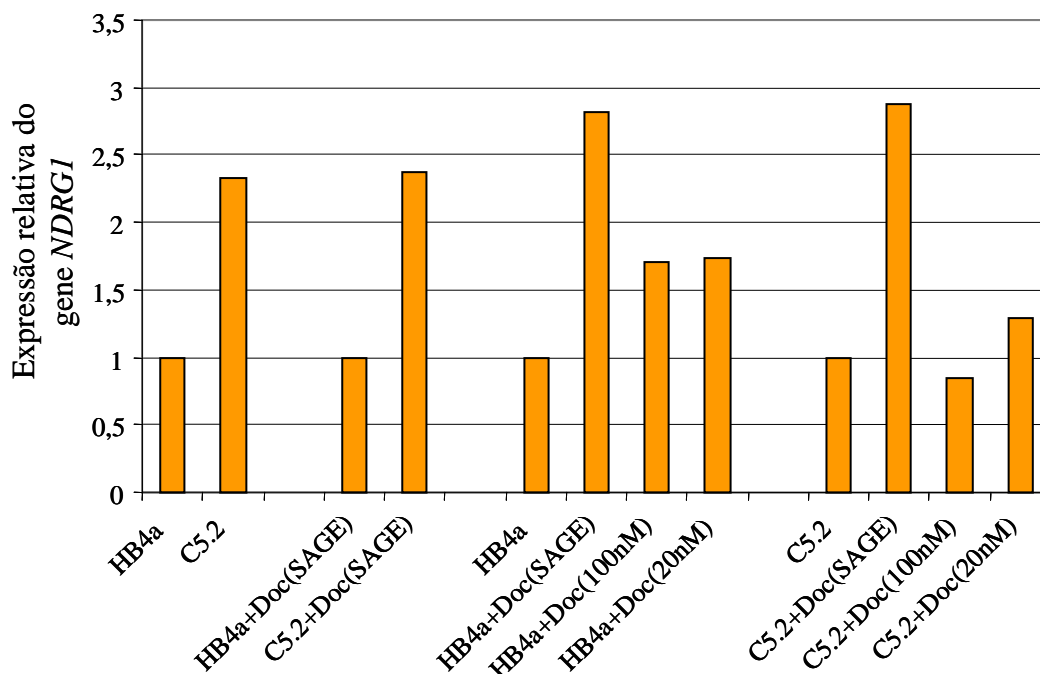
para esse gene pelo SAGE, que não mostrou diferenças de expressão nas linhagens de células HB4a e C5.2 na ausência do tratamento com docetaxel, no entanto, encontrou aumento de expressão desse gene nas células C5.2 em relação às células HB4a, após exposição intensa ao docetaxel. As células HB4a tratadas com docetaxel, comparadas às mesmas células não tratadas, apresentaram um aumento de 2,4 vezes na expressão de *C6orf115* após tratamento intensivo, não observado na técnica de SAGE, e de 3 vezes após administração de 20 ou 100nM de docetaxel, por 24 horas. Na análise das células C5.2 tratadas com docetaxel, em relação às mesmas células não tratadas, foi encontrado um aumento na expressão do gene *C6orf115* de 3,3 vezes nas células submetidas ao tratamento intensivo e nas que receberam 100nM de docetaxel, e de 3,9 vezes quando a dose administrada foi de 20nM (Tabela 3; Figura 36).

O gene *NDRG1*, apesar de não obedecer ao corte estabelecido de ≥ 4 vezes de diferença na expressão gênica, foi incluído nos experimentos de validação por ser um gene de interesse do nosso grupo de pesquisa. Os resultados obtidos na análise da expressão do gene *NDRG1* por qPCR mostraram que é possível validar, também, as diferenças pequenas de expressão gênica, encontradas pela técnica de SAGE (Tabela 3; Figura 37). Na análise do gene *NDRG1* por qPCR foi encontrado um aumento de 2,3 vezes na expressão desse gene nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel, confirmando os dados de SAGE. Esse mesmo aumento na expressão de *NDRG1* foi detectado também na linhagem celular C5.2, em relação às células HB4a, após o tratamento com docetaxel, embora, nas bibliotecas de SAGE observou-se uma tendência a redução da expressão desse gene nas células C5.2 após exposição ao docetaxel (Tabela 3; Figura 37).



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *C6orf115* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 36 – Análise da expressão relativa do gene *C6orf115* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.



Legenda: Foram utilizadas como amostras referência, da esquerda para a direita, os cDNAs das células HB4a sem tratamento, HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel. As barras representam a expressão relativa de *NDRG1* nas células HB4a e C5.2, na ausência ou na presença do tratamento com docetaxel, após normalização para o gene de referência, *GAPDH*, como descrito no item Material e Métodos. Doc (SAGE) – tratamento intensivo com doses crescentes de docetaxel; Doc (100nM) – tratamento com 100nM de docetaxel por 24 horas; Doc (20nM) – tratamento com 20nM de docetaxel por 24 horas.

Figura 37 – Análise da expressão relativa do gene *NDRG1* nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, por PCR em tempo real.

Comparando-se as células HB4a tratadas com docetaxel com as células HB4a não tratadas, e as células C5.2 tratadas com docetaxel com as células C5.2 não tratadas, observou-se um aumento significativo, de 2,8 vezes, nas duas linhagens celulares submetidas ao tratamento intensivo com docetaxel (Tabela 3; Figura 37). Após o tratamento da linhagem de células HB4a com 20 ou 100nM de docetaxel, por 24 horas, foi observado um aumento de 1,7 vezes na expressão de *NDRG1*, em relação às células HB4a não tratadas. No tratamento das células C5.2 com docetaxel por 24 horas não foram encontradas variações significativas de expressão de *NDRG1* (Figura 37).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A quimioterapia é a forma de tratamento mais utilizada no câncer de mama, entretanto, o sucesso desse tipo de terapia é frequentemente comprometido pela resistência dos tumores às drogas administradas. O docetaxel é, atualmente, a droga mais eficaz no tratamento de tumores de mama avançados (HAMILTON e HORTOBAGYI 2005). Os mecanismos envolvidos na resistência ao docetaxel, apresentada por uma parcela significativa das pacientes com câncer de mama tratadas com essa droga, permanecem desconhecidos, no entanto, dados de literatura demonstram a participação do gene ERBB2 nesse processo. Uma forte evidência do envolvimento de ERBB2 na resistência ao docetaxel é o sucesso do tratamento de tumores de mama avançados, ERBB2-positivos, com docetaxel combinado a Herceptina (NABHOLTZ e GLICOROV 2005).

O aumento da expressão de ERBB2 leva a ativação de vias de transdução de sinais importantes, incluindo ras/MAPK e PI3K/AKT, que regulam genes envolvidos em processos como proliferação e morte celular, e contribuem para a transformação maligna da mama (HUNG e LAU 1999; YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HOLBRO et al. 2003; ZHOU e HUNG 2003; MARMOR et al. 2004). A expressão aumentada de ERBB2 é encontrada em 15-30% dos tumores de mama e está associada a um pior prognóstico da doença, e a resistência a hormônio e quimioterapia (SLAMON et al. 1987; ROSS e FLETCHER 1998). A identificação de genes regulados pela expressão aumentada de ERBB2 pode contribuir para uma

melhor compreensão dos processos de tumorigênese e quimioresistência, e auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama.

Nesse estudo, utilizando a técnica de SAGE, foi determinado o perfil de expressão gênica de duas linhagens de células de mama normal, HB4a (STAMPS et al. 1994), que apresenta expressão basal de *ERBB2*, e C5.2 (HARRIS et al. 1999), que é um clone de HB4a, e possui expressão aumentada de *ERBB2*, na ausência e na presença do tratamento intensivo com docetaxel.

A técnica de SAGE nos permitiu a identificação de um número muito grande de transcritos, que caracterizaram as linhagens celulares com expressão basal (HB4a) e aumentada (C5.2) do gene *ERBB2*, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel. Os dados obtidos em nosso trabalho confirmaram a expressão diferencial de genes previamente descritos por outros autores, e ampliaram o número de novos genes candidatos, regulados por *ERBB2* em células de mama. A comparação dos nossos resultados de SAGE com os obtidos por MACKAY et al. (2003), que analisou a expressão gênica das mesmas células (HB4a e C5.2) pela técnica de cDNA microarray, revelou muitas similaridades. Entre os 61 transcritos identificados pelos autores, muitos também foram encontrados em nosso trabalho, com expressão aumentada, como *LGALS1*, *CRIP1*, *S100P*, *MGC11242*, *SQLIE*, *HSPB1*, *DNAJB6*, ou reduzida, incluindo *MYL9*, *SPARC*, *FNI*, *TAGLN*, *SPINT2*, *GTF3B*, *PMSD8*, nas células C5.2 comparadas às HB4a. O mesmo padrão de expressão de vários genes, observado pelas técnicas de SAGE e cDNA microarrays, demonstra a sensibilidade de ambos os métodos na determinação do perfil de expressão gênica. Entretanto, o uso do SAGE nos permitiu a identificação de um maior número de transcritos regulados por *ERBB2*, incluindo aqueles que apresentam função desconhecida.

Considerando o número elevado de transcritos encontrados diferencialmente expressos na comparação das quatro bibliotecas de SAGE, geradas a partir das células HB4a e C5.2, antes e após exposição intensa ao docetaxel, foi necessário determinar critérios para a seleção de um grupo de transcritos que seria o foco de análise nesse estudo. Foi estabelecido que seriam analisados os transcritos diferencialmente expressos com uma razão maior ou igual a quatro vezes. Entre esses transcritos, os 200 mais diferencialmente expressos na comparação das bibliotecas geradas foram anotados, de acordo com o processo biológico.

Na comparação dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens celulares HB4a e C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel, os genes mais expressos nas células HB4a estavam envolvidos principalmente na organização do citoesqueleto e transdução de sinais, e os mais expressos nas células C5.2, em apoptose, processamento de RNA, transporte e proteína “folding”. Na mesma comparação após o tratamento com docetaxel, os genes que atuam na organização de citoesqueleto e transdução de sinais continuaram mais representados nas células HB4, e houve um aumento da porcentagem de genes envolvidos em resposta imune, ciclo celular e adesão celular nessas células; enquanto na linhagem celular C5.2 foi mantida a maior proporção de genes que participam do transporte nas células, e ocorreu um aumento na porcentagem de genes que atuam na regulação da transcrição.

A anotação funcional dos genes diferencialmente expressos entre as células HB4a, antes e após o tratamento com docetaxel, mostrou um perfil de representação dos processos biológicos semelhante ao obtido na comparação dos genes diferencialmente expressos nas células C5.2, antes e após exposição ao docetaxel.

Nas células HB4a e C5.2 não tratadas foi encontrado um maior número de genes envolvidos em proteína “folding”, transporte e metabolismo, e após o tratamento foi observada uma maior porcentagem de genes que participam da adesão celular, organização de citoesqueleto, resposta imune e transdução de sinais. Além disso, nas células C5.2 não tratadas foi observado uma maior número de genes de ciclo celular, e nesta mesma linhagem celular após o tratamento com docetaxel foi encontrada uma maior proporção de genes associados a apoptose e proliferação celular.

A maior porcentagem de genes envolvidos em resposta imune encontrada nas linhagens celulares HB4a e C5.2 após exposição ao docetaxel está associada a resposta das células ao estresse causado pelo tratamento. Entre os genes associados à resposta imune, estão incluídos, principalmente, genes induzidos por interferon, como *IFITM1*, *IFITM3*, *IFIT1*, *IFI27*, *G1P2*, *G1P3* e *MX1*. Embora as células C5.2 tratadas com docetaxel tenham apresentado um aumento na expressão de genes envolvidos na resposta imune, em relação às mesma células não tratadas, na comparação com as células HB4a na presença do tratamento com docetaxel, não foi encontrado nenhum gene com esta classificação (HB4a tratada, 6% vs C5.2 tratada, 0%), indicando a maior sensibilidade da HB4a ao tratamento com docetaxel. Uma outra evidência do efeito do tratamento das células HB4a e C5.2 com docetaxel é a menor porcentagem de genes envolvidos em metabolismo nas células tratadas comparadas às mesmas linhagens celulares na ausência do tratamento.

A seleção de vinte e um genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de SAGE, para a validação por qPCR, foi realizada com base na anotação funcional e na abundância dos transcritos. Além disso, foram considerados os dados de literatura disponíveis sobre o papel desempenhado por esses genes na mama.

A descoberta de marcadores moleculares associados ao câncer, que podem ser detectados nos estádios iniciais da doença, representa uma grande promessa no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes com câncer. Dessa forma, a maior parte dos genes escolhidos para serem validados, apresentaram uma expressão diferencial entre as células HB4a e C5.2 na ausência do tratamento com docetaxel.

Uma das diferenças mais importantes observada na comparação entre as bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, na ausência de tratamento, foi a redução na expressão de genes associados a organização de citoesqueleto nas células C5.2. Esse dado é consistente com a forma desorganizada e irregular observada nas células C5.2 em Matrigel, comparada a linhagem celular parental HB4a (HARRIS et al. 1999).

Alterações na organização do citoesqueleto, especialmente nos filamentos de actina, desempenham um papel importante no processo de tumorigênese. Modificações na estrutura dos filamentos de actina estão relacionadas à diminuição da expressão de várias proteínas de citoesqueleto, entre elas α -actinina e tropomiosina (PAWLAK e HELFMAN 2001). Os genes *ACTN1* (α -actinina 1) e *TPM1* (tropomiosina 1) foram encontrados com expressão reduzida nas células C5.2, que apresentam expressão aumentada de *ERBB2*, comparadas à linhagem celular parental HB4a, na ausência de tratamento, pelas técnicas de SAGE e qPCR.

A *ACTN1* é um dos membros da família da α -actinina, que se liga a actina e localiza-se nas fibras de estresse nas células não musculares (EDLUND et al. 2001). A α -actinina desempenha um papel essencial na manutenção da estabilidade do citoesqueleto de actina, pois possibilita a ligação direta entre fibras de estresse de actina e receptores de integrina, nas adesões focais (FRALEY et al. 2005). Foi

observado que a ligação a PI-3K regula a associação de α -actinina aos filamentos de actina e receptores de integrina, influenciando na plasticidade e remodelamento do citoesqueleto de actina (FRALEY et al. 2005). A α -actinina interage, também, com a MEKK1 (CHRISTERSON et al. 1999), que assim como o PI-3K participa da via de sinalização de ERBB2. Apesar da participação de ACTN1 na carcinogênese ainda não ter sido elucidada, estudos mostram que a expressão de α -actinina é capaz de suprimir a transformação das células *in vitro* e a tumorigênese em camundongos inoculados com células transfectadas com α -actinina (GLUCK e BEN-ZE'EV 1994; NIKOLOPOULOS et al. 2000).

A tropomiosina 1 (TPM1) integra uma família de proteínas que se ligam a actina, e apresentam uma função importante na estabilização dos microfilamentos (PAWLAK e HELFMAN 2001). A redução na expressão de TPM1 é encontrada em várias células transformadas, incluindo células de câncer de mama, e o restabelecimento da expressão desse gene é capaz de reverter o fenótipo maligno de células transformadas por oncogenes (PRASAD et al. 1993). Tumores primários de mama expressam níveis baixos ou não expressam TPM1 (RAVAL et al. 2003). Foi observada a supressão do fenótipo transformado de células de câncer de mama, MCF-7, pela re-expressão de TPM1 (MAHADEV et al. 2002). Investigações sobre os mecanismos envolvidos na supressão tumoral induzida por TPM1, revelaram que TPM1 induz anoikis nas células de câncer de mama (RAVAL et al. 2003). Uma redução significativa da expressão de TPM1 foi encontrada, em nosso trabalho, nas células HB4a tratadas com docetaxel comparadas às mesmas células não tratadas, sugerindo uma possível participação desse gene na quimiosensibilidade em câncer de mama.

A baixa expressão de ACTN1 e TPM1 pode ser resultante da ativação das vias de sinalização de ERBB2, que induz reorganização do citoesqueleto e motilidade, e provoca o aumento do potencial invasivo e metastático das células cancerosas (FELDNER e BRANDT 2002).

A tubulina é uma proteína que desempenha um papel fundamental na organização do citoesqueleto, e tem uma importância particular em nosso estudo, na medida que o docetaxel age nos microtúbulos, inibindo a sua despolimerização. Alterações na β -tubulina foram associadas à resistência ao docetaxel em células de câncer de mama (FULTON e SPENCER 1996; SHALLI et al. 2005). Nossos dados de SAGE mostraram um aumento na expressão do gene tubulina beta 2 (TUBB2) nas células HB4 e C5.2 tratadas com docetaxel, em relação as mesmas linhagens celulares na ausência de tratamento, sugerindo a participação desse gene na resistência ao docetaxel nestas células. O aumento da expressão de TUBB2 foi descrito em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 resistentes ao docetaxel (SHALLI et al. 2005). Outros genes previamente associados com a aquisição de resistência ao docetaxel, como p27 (BROWN et al. 2004) e MDR-1 (FULTON e SPENCER 1996), não foram encontrados diferencialmente expressos em nossas bibliotecas de SAGE, indicando que outros mecanismos estão associados a quimioresistência em nosso modelo.

Os resultados obtidos no SAGE e validados por qPCR, aliados ao dados de literatura, apontam os genes *SPARC* e *RUVBL1* como fortes candidatos a participarem da quimioresistência ao docetaxel adquirida pelas células HB4a e C5.2.

O gene *SPARC*, também conhecido como osteonectina ou BM-40, codifica uma glicoproteína secretada, que possui grande afinidade de ligação ao cálcio, e

localiza-se na matriz celular (YAN e SAGE 1999). O SPARC modula interações entre células e matriz extracelular, e participa da regulação da adesão celular, proliferação celular, migração celular, angiogênese e remodelamento tecidual. A expressão de SPARC é encontrada durante o desenvolvimento e em processos que abalam a matriz extracelular, como na resposta a injúria e na progressão tumoral (BRADSHAW e SAGE 2001). O papel exato desempenhado pelo SPARC na tumorigênese ainda não foi elucidado, mas parece estar relacionado ao tipo de tumor e seu microambiente.

Em câncer de mama os dados de literatura são controversos, uma maior expressão de SPARC foi associada tanto à inibição quanto à promoção da tumorigênese mamária. A indução da expressão do gene SPARC na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 resultou em inibição da proliferação celular *in vitro* (DHANESUAN et al. 2002), e foi capaz de inibir a invasão celular e a ocorrência de metástase em camundongos injetados com essas células (KOBLINSKI et al. 2005). A implantação de tumores em camundongos selvagens ($SP^{+/+}$) e nulos ($SP^{-/-}$) para o gene SPARC, mostrou um maior crescimento tumoral nos camundongos $SP^{-/-}$, decorrente de alterações na ECM, desses camundongos $SP^{-/-}$, que criaram um ambiente apropriado para a progressão tumoral (BREKKEN et al. 2003). Em estudo recente, com camundongos que receberam células tumorais humanas transfectadas com o gene SPARC, foi demonstrado que a expressão aumentada desse gene está associada à inibição do crescimento tumoral e da angiogênese, e a alterações na ECM (CHLENSKI et al. 2006).

Em contraste, a expressão elevada de SPARC foi associada ao desenvolvimento tumoral, e a um pior prognóstico da doença, com redução

significativa da sobrevida global em pacientes com câncer de mama (WATKINS et al. 2005). Em um estudo *in vitro*, com a linhagem celular de câncer de mama MCF-7, foi observado que o aumento na expressão de SPARC, em resposta a expressão aumentada de c-jun, estimula a migração e a invasão celular (BRIGGS et al. 2002).

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram uma redução considerável da expressão do gene *SPARC* na linhagem celular C5.2, que apresenta expressão aumentada de *ERBB2*, em relação às células HB4a, e sugerem que a perda ou redução da expressão de *SPARC* está associada a transformação dessas células. Uma menor expressão do gene *SPARC* nas células C5.2 comparadas às células HB4a também foi encontrada utilizando-se a técnica de cDNA microarray (MACKAY et al. 2003). As células C5.2, apesar de não originarem tumores quando injetadas em camundongos, apresentam evidências de transformação *in vitro*, decorrente da expressão aumentada de *ERBB2* (HARRIS et al. 1999). A análise do perfil de expressão gênica, por DNA microarray, da linhagem celular NIH3T3 transfectada com o gene *ERBB2*, que origina tumor quando inoculada em camundongo, também mostrou expressão reduzida de *SPARC*, comparada à linhagem celular parental (BECKERS et al. 2005). Foi observada a interação do gene *SPARC* com fatores de crescimento levando a inibição da proliferação celular induzida por VEGF, bFGF e PDGF (YAN e SAGE 1999; BRADSHAW e SAGE 2001). O gene *SPARC* parece modular, também, a atividade de TGF β (BRADSHAW e SAGE 2001).

Nossos resultados, obtidos pela técnica de SAGE e confirmados por qPCR, mostraram uma redução significativa da expressão do gene *SPARC* nas células HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, em relação às células HB4a não tratadas. Esta redução na expressão de *SPARC* após exposição ao docetaxel nas células HB4a

foi semelhante à observada na linhagem celular C5.2, na ausência do tratamento com docetaxel, comparada às células HB4a. Por outro lado, as células C5.2 não alteraram de maneira significativa a expressão de *SPARC* após o tratamento com docetaxel. A comparação das duas linhagens celulares, HB4a e C5.2, após o tratamento intensivo com docetaxel mostrou exatamente o mesmo nível de expressão do gene *SPARC*. Esses resultados sugerem que a expressão de *SPARC* pode ser um indicador de sensibilidade ao tratamento com docetaxel em células de mama.

A participação do *SPARC* na resistência à quimioterapia foi observada, até o momento, apenas em câncer colorretal (TAI et al. 2005). Uma baixa expressão do gene *SPARC* foi encontrada em células de câncer colônico resistentes a quimio e a radioterapia. Ensaio *in vitro* e *in vivo* mostraram que o aumento da expressão de *SPARC* foi capaz de restaurar a radio e a quimiossensibilidade das células de câncer colônico. Além disso, foi observada que a administração de *SPARC* e 5-fluorouracil em camundongos que haviam sido inoculados com as células colônicas resistentes, potencializou o efeito da quimioterapia e levou a uma regressão tumoral significativa nesses animais (TAI et al. 2005).

Embora o mecanismo de ação do *SPARC* na sensibilização dos tumores a quimioterapia ainda não tenha sido compreendido, isso parece ocorrer independente da droga administrada. Experimentos adicionais serão realizados para confirmar o papel de *SPARC* na sensibilidade a quimioterapia em câncer de mama.

Um perfil de expressão semelhante ao do gene *SPARC* foi encontrado para o gene *RUVBL1* pelas técnicas de SAGE e qPCR. O *RUVBL1*, também conhecido como TIP49a ou Pontin52, codifica uma proteína que pertence à família das helicases dependentes de ATP. Dados de literatura mostram que *RUVBL1*

desempenha um papel fundamental na carcinogênese mediada pelo gene c-myc (WOOD et al. 2000; DUGAN et al. 2002). Os resultados observados em um estudo *in vitro* mostraram que o gene RUVBL1 atua, também, na modulação da atividade de apoptose mediada pelos genes c-myc e E2F1 (DUGAN et al. 2002). Um estudo realizado por FENG et al. (2003) demonstrou que RUVBL1 é um cofator importante na transformação neoplásica mediada por β -catenina. A expressão da forma mutante de RUVBL1 (com atividade ATPase deficiente), ou a inibição de RUVBL1, pelo método de RNA de interferência (siRNA), levaram a inibição da ativação de genes regulados por β -catenina/TCF, possivelmente através de mecanismos que envolvem o remodelamento da cromatina (FENG et al. 2003). Em câncer colônico, foi observado que o RUVBL1 atua na regulação da transcrição do gene COX-2, que é um dos alvos ativados pela sinalização do Wnt, e está frequentemente aumentando nesse tipo de tumor (CARLSON et al. 2003).

Nossos dados obtidos pelo SAGE, e confirmados por qPCR, mostraram a expressão reduzida de *RUVBL1* nas células C5.2 não tratadas, e nas células HB4a e C5.2 após tratamento intensivo com docetaxel. Um dado bastante interessante para o nosso trabalho, encontrado na literatura, é a associação de RUVBL1 com a tubulina durante a mitose, uma vez que o docetaxel age nos microtúbulos celulares. Experimentos *in vitro* mostraram que a polimerização da tubulina, induzida pelo tratamento com paclitaxel, é aumentada na presença de RUVBL1 (GARTNER et al. 2003). Nossos resultados são coerentes com os dados de literatura e sugerem que a expressão de RUVBL1 está associada a quimiosensibilidade ao docetaxel em células de mama. Diferentemente do SPARC, o gene RUVBL1 parece estar relacionado especificamente à sensibilidade ao tratamento com os taxanos, paclitaxel e docetaxel.

A classificação dos genes diferencialmente expressos entre as células HB4a e C5.2, quanto aos processos biológicos em que estão envolvidos, mostrou uma maior porcentagem de genes associados a transdução de sinais na linhagem celular HB4a em relação a C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel. Isso pode representar uma concentração da sinalização celular em ERBB2 nas células C5.2, que apresenta expressão aumentada desse gene.

O gene *SFRP1* participa da via de transdução de sinais do Wnt, e foi encontrado menos expresso nas células C5.2 em relação às HB4a, na ausência de tratamento. A ativação descontrolada da via de sinalização do Wnt desempenha um papel importante no desenvolvimento de tumores, como de mama e cólon. O *SFRP1* é um regulador negativo da via do Wnt. Tumores de mama apresentam perda ou baixos níveis de expressão de *SFRP1* (UGOLINI et al. 2001; KLOPOCKI et al. 2004). A perda de *SFRP1* está associada à redução da sobrevida global das pacientes com câncer de mama em estágio inicial (KLOPOCKI et al. 2004). Assim como nos genes *TPM1*, *SPARC* e *RUVBL1*, discutidos anteriormente, foi observada uma redução na expressão de *SFRP1* nas células HB4a após tratamento intensivo com docetaxel, em relação à mesma linhagem de células não tratadas, que foi equivalente ao encontrado nas células C5.2 comparadas às HB4a, na ausência de tratamento, indicando que possa estar envolvido na sensibilidade a quimioterápicos em câncer de mama.

Diferentemente dos genes já abordados nesta seção, que apresentaram redução de expressão nas células C5.2 em relação às HB4a, somente na ausência de tratamento, o *ETFB* manteve a expressão diferencial entre as linhagens celulares, também, após o tratamento com docetaxel. O *ETFB* está envolvido no transporte de

elétrons, no entanto, até o momento, existem poucas informações sobre esse gene na literatura. A ocorrência de mutação no gene *ETFB* é responsável por uma doença autossômica recessiva que interfere no metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, denominada MADD (“Multiple Acyl-CoA Dehydrogenation Deficiency”) (OLSEN et al. 2003). Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que a perda de expressão do gene *ETFB* possa participar do processo de tumorigênese da mama, mediada pelo *ERBB2*, entretanto, não existe, ainda, nenhum dado na literatura sobre o envolvimento desse gene em câncer.

O gene *DUSP1* foi encontrado menos expresso nas células C5.2 comparadas às células HB4a, antes e depois do tratamento com docetaxel, pela técnica de SAGE, no entanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão desse gene, na comparação das células HB4 e C5.2, por qPCR. Os resultados obtidos por qPCR parecem mais coerentes com os dados de literatura. O gene *DUSP1*, também denominado *MKP1*, é induzido por fatores de crescimento e situações de estresse, como hipoxia (LIU et al. 2005). Estudos experimentais com a linhagem de câncer de mama BT474 mostraram que *DUSP1* apresenta atividade anti-apoptótica (SMALL et al. 2004). Foi demonstrado que a ativação de *DUSP1* pelo receptor de glucocorticóide (GR), em células de câncer de mama, desempenha um papel importante na inibição da ativação da MAPK e de apoptose induzida pelo tratamento com paclitaxel (WU et al. 2005). Após o tratamento intensivo com docetaxel foi encontrado aumento de 3,5 e 2,2 vezes na expressão de *DUSP1* nas células HB4a e C5.2, respectivamente, em comparação com as mesmas células na ausência de tratamento, pela técnica de qPCR. O aumento de expressão de *DUSP1* nas células C5.2 tratadas, comparadas às não tratadas, foi encontrado, também, pelo SAGE. Esta

expressão aumentada de *DUSP1* observada nas células HB4a e C5.2 resistentes ao docetaxel, está de acordo com os dados de literatura, que mostram a participação desse gene na inibição de apoptose mediada por um taxano em células de câncer de mama (WU et al. 2005), indicando uma possível participação de *DUSP1* na quimioresistência em nosso sistema.

A desregulação do processo de apoptose desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão da tumorigênese, e na resistência às terapias utilizadas no tratamento do câncer. Diversas vias de sinalização, anti e pró-apoptóticas, são responsáveis pelo controle de apoptose nas células. Alterações nestas vias de transdução de sinais inibem a apoptose e estimulam a sobrevivência celular (JAATTELA 1999). A expressão aumentada do gene *ERBB2* contribui para o descontrole da apoptose, especialmente, pela ativação da via PI3K-AKT.

Na comparação dos genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas de SAGE das linhagens celulares, um maior número de genes que participa da apoptose celular foi observado mais expresso nas células C5.2 comparadas as HB4a, na ausência de tratamento com docetaxel. A maioria destes genes (*PBP*, *PDCD4*, *ANP32B*, *BTG1*, *BNIP1*, *LGALS1*) apresenta atividade pró-apoptótica, e, provavelmente, foi ativada em resposta ao estresse oncogênico sofrido pelas células C5.2. Entretanto, é possível, que a indução da apoptose por esses genes, nas células C5.2, esteja sendo impedida pela ativação de PI3K e AKT, decorrente da expressão aumentada de *ERBB2*, que promovem a sobrevivência celular (VIVANCO e SAWYERS 2002; ZHOU e HUNG 2003). A proteína Akt protege as células contra a apoptose através da fosforilação e inibição de proteínas pró-apoptóticas, como Bad (DATTA et al. 1997).

Entre os genes envolvidos em apoptose, que apresentaram expressão aumentada nas células C5.2 em relação as HB4a, foram escolhidos três para serem analisados por qPCR, dois (*ANP32B* e *BTG1*) que ainda não foram descritos em câncer de mama, e um (*LGALS1*) que foi recentemente associado a indução de apoptose em células de câncer de mama.

O ANP32B, ou PHAPI2, é membro de uma família de proteínas conservada evolutivamente, que pertence a superfamília de proteínas que apresenta repetições ricas em leucina (MATILLA e RADRIZZANI 2005). Acredita-se que os membros da família ANP32 participem da modulação da sinalização celular (MATILLA e RADRIZZANI 2005). Embora as funções molecular e biológica de ANP32B ainda não tenham sido claramente identificadas, esse gene parece estar envolvido na promoção da apoptose, pela ativação de caspase 9 (JIANG et al. 2003). Dados de literatura mostram que o ANP32A, que apresenta grande homologia com ANP32B, é capaz de se ligar a proteínas associadas a microtúbulos (MAPs) (MATILLA e RADRIZZANI 2005). As linhagens celulares HB4a e C5.2 apresentaram aumento na expressão de *ANP32B* após o tratamento com docetaxel, que chegou a 8,5 vezes nas células HB4a tratadas com 100nM de docetaxel, por 24 horas, em relação às células HB4a não tratadas.

Integrante da família dos genes anti-proliferativos (BTG/Tob), o gene BTG1, foi identificado em uma translocação cromossômica observada em leucemia linfocítica crônica de células B (ROUAULT et al. 1992). O gene BTG1 atua na regulação do crescimento celular, inibindo a proliferação e promovendo a apoptose nas células. Experimentos *in vitro* demonstraram que a expressão aumentada de BTG1, em células NIH3T3, inibiu a proliferação celular (ROUAULT et al. 1992) e

provocou um aumento significativo na apoptose (CORJAY et al. 1998). Em um estudo com células de leucemia tratadas com glucocorticóides foi encontrada a expressão aumentada de BTG1 associada à presença de apoptose (YOSHIDA et al. 2002). O aumento da expressão de BTG1 foi associado, também, a um maior potencial de migração e a angiogênese, em um experimento, *in vitro*, com células endoteliais (IWAI et al. 2004).

Diferentes perfis de expressão gênica da galectina-1 (LGALS1) têm sido associados ao câncer. A expressão aumentada de LGALS1 foi observada em vários tipos de tumor, entre eles, bexiga, tireóide, endométrio e ovário, e em alguns casos foi associada a um pior prognóstico (VAN DEN BRULE et al. 2004). O gene LGALS1 atua na regulação de processos importantes como adesão celular, crescimento celular e apoptose (SCOTT e WEINBERG 2004). Em câncer de mama, um estudo recente mostrou a indução de apoptose em células MCF-7 pela galectina-1 na presença de um estímulo de estresse (WIEST et al. 2005). Os resultados obtidos em nosso trabalho, pelas técnicas de SAGE e qPCR, confirmam os dados de MACKAY et al. (2003), que encontraram uma expressão aumentada do gene *LGALS1* nas células C5.2 comparadas às HB4a, pelo método de cDNA microarray.

As análises de SAGE revelaram a expressão aumentada de vários genes que codificam proteínas de choque térmico (HSP), como Hsp90, Hsp70, Hsp40 e Hsp27, nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência de tratamento. Estas proteínas, denominadas chaperonas são induzidas pelo estresse e atuam no “folding” de diversas proteínas (SOTI e CSERMELY 1998). A expressão aumentada destas proteínas é encontrada em vários tumores, incluindo o de mama, e está associada a um pior prognóstico e a resistência a terapia (SOTI e CSERMELY 1998;

JAATTELA 1999). Algumas proteínas de choque térmico, como Hsp90, Hsp70 e Hsp27, desempenham papel importante na inibição da apoptose (SOTI e CSERMELY 1998; ZHANG et al. 2005). Embora o aumento da expressão de proteínas de choque térmico nas células C5.2 pode ser decorrente do estresse oncogênico sofrido por esta linhagem pela presença da expressão aumentada de ERBB2, isso pode estar contribuindo para o aumento da sobrevivência destas células e a quimioresistência associada a ERBB2.

O gene CENPH, foi identificado pela sua expressão aumentada nas células C5.2 comparadas às HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel, e é um componente fundamental na formação do complexo centrômero-cinetócoro ativo (SUGATA et al. 2000). CENPH desempenha um papel importante na mitose, atuando na conexão dos centrômeros aos microtúbulos (FUKAGAWA et al. 2001; TOMONAGA et al. 2005). Recentemente, a expressão aumentada de CENPH foi encontrada em tumores primários coloretais, e associada à ocorrência de defeitos na mitose (TOMONAGA et al. 2005). O gene CENPH, pela sua localização e participação na mitose, pode ser considerado um importante gene candidato a participar da aquisição de resistência ao docetaxel nas células de mama. As células HB4a e C5.2, após o tratamento com docetaxel, comparadas às mesmas células não tratadas, mostraram aumento na expressão de *CENPH*. Novos experimentos devem ser realizados para a compreensão do papel do gene CENPH nessas células resistentes ao docetaxel.

Uma característica comum, observada na comparação dos resultados obtidos na anotação funcional das bibliotecas de SAGE, foi a presença de uma grande porcentagem de genes associados à regulação da transcrição nas células HB4a e

C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel. Esses genes atuam como coativadores ou corepressores, modulando a expressão de genes que desempenham funções importantes em processos celulares como proliferação celular, adesão celular, apoptose, entre outros. O gene *AES* é um corepressor transcricional que foi encontrado mais expresso na linhagem celular C5.2 do que nas células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel. Dados de literatura mostraram que a interação de *AES* com *BIT1*, uma proteína mitocondrial, induz apoptose, de forma caspase-independente (JAN et al. 2004). Os aumentos significativos observados na expressão do gene *AES* nas linhagens celulares tratadas com docetaxel, sobretudo nas células HB4a, em relação às mesmas células não tratadas, sugerem a participação desse gene na resposta ao docetaxel. Experimentos adicionais são necessários para elucidação de uma possível participação do gene *AES* na quimioresistência em células mamárias.

Os genes *HDGF* e *CAVI* foram identificados por estarem mais expressos nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência do tratamento com docetaxel, nas bibliotecas de SAGE. Entretanto, a análise desses genes por qPCR mostrou variações muito pequenas no perfil de expressão gênica e, de maneira geral, não confirmou os resultados obtidos pelo SAGE.

A análise das bibliotecas de SAGE geradas mostraram apenas 2 tags do gene *CAVI* nas células HB4a tratadas com docetaxel, e nenhuma tag desse gene nas células C5.2 após exposição ao docetaxel. Estudos experimentais com uma linhagem celular de câncer de mama resistente a doxorrubicina, demonstraram que a expressão de *CAVI* nestas células é capaz de reverter à resistência a drogas e tornar essas células sensíveis a quimioterapia, através da inibição da glicoproteína-P (CAI e CHEN 2004; ZHU et al. 2004). A baixa expressão de *CAVI* nas células HB4a e C5.2

tratadas com docetaxel, observada no SAGE, sugere que esse gene possa contribuir para a quimioresistência nestas células. Entretanto, nas bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, após o tratamento com docetaxel, não foi detectada a expressão do gene *MDR1*, que codifica a glicoproteína-P, indicando a presença de um outro mecanismo de ação de CAV1 em nosso sistema.

O aumento de apenas duas vezes da expressão do gene *NDRG1*, nas células C5.2 comparadas às células HB4a, pela técnica de SAGE, foi reproduzido na análise por qPCR, demonstrando que é possível validar, também, as diferenças menores de expressão encontradas pelo método de SAGE. Embora não esteja no grupo de genes diferencialmente expressos por uma razão de no mínimo 4 vezes, o *NDRG1* foi analisado por ser um gene de interesse para o nosso grupo de pesquisa. O gene *NDRG1*, também conhecido como *DRG1* ou *RIT42*, está associado à resposta ao estresse nas células, é induzido por hipoxia e apresenta uma maior expressão em tecido tumoral comparado ao normal em mama, pulmão, cérebro, fígado, entre outros (CANGUL 2004). Dados de literatura sobre a participação do gene *NDRG1* na carcinogênese são ainda controversos. Estudos com modelos animais mostraram que *NDRG1* é um gene supressor de metástase em tumores, como o de próstata (BANDYOPADHYAY et al. 2003). No câncer de mama, a baixa expressão de *NDRG1* foi associada a estágios mais avançados da doença e a uma pior sobrevida das pacientes (BANDYOPADHYAY et al. 2004a). Em tumores de mama e próstata foi observado o controle da expressão de *NDRG1* pelo gene supressor de tumor *PTEN*, por uma via dependente de *AKT*, sugerindo que a expressão de ambos os genes seria um indicativo de bom prognóstico nestes tipos de câncer (BANDYOPADHYAY et al. 2004b). O gene *NDRG1* é alvo, também, da regulação

transcricional de p53. Dados obtidos em experimentos de RNA de interferência e indução de expressão gênica sugerem uma participação fundamental de NDRG1 na apoptose mediada por p53 (STEIN et al. 2004). Além disso, foi demonstrado que NDRG1 desempenha um papel importante na mitose, através da associação com microtúbulos (KIM et al. 2004). Em câncer colorretal foi demonstrada uma correlação entre o aumento da expressão de NDRG1 e a resistência ao tratamento com irinotecan (SHAH et al. 2005). Os resultados obtidos pelo SAGE e qPCR mostraram um aumento de três vezes na expressão de *NDRG1* na linhagem celular HB4a tratada com docetaxel, em relação às mesmas células não tratadas.

A maior diferença na expressão gênica observada na comparação das bibliotecas de SAGE foi de *MATR3*. Esse gene mostrou-se aumentado nas células C5.2, 230 vezes, antes, e 451 vezes, após o tratamento com docetaxel, em relação às células HB4a na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, respectivamente. O gene *MATR3* apresenta duas variantes que codificam a mesma proteína, que se localiza na matriz nuclear. Até o momento, os dados de literatura sobre a *MATR3* são escassos, e ainda não foi descrita a participação desse gene na carcinogênese.

As bibliotecas de SAGE da linhagem celular C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, apresentaram um maior número de ESTs, clones de cDNA, ORFs identificadas em regiões cromossômicas, e proteínas hipotéticas, comparadas às bibliotecas das células HB4a. Esses transcritos que ainda não apresentam uma função definida possuem grande importância, pois representam novos marcadores potenciais dos processos de tumorigênese e quimioresistência na mama.

Entre esses transcritos identificados, foram selecionados 5 para a validação

por qPCR, 4 genes (*MGC11242*, *FAM98A*, *FLJ13448*, *C20orf35*) encontrados mais expressos nas células C5.2 comparadas às células HB4a, na ausência de tratamento, e um gene (*C6orf115*) identificado com expressão aumentada nas células C5.2 em relação às HB4a, após o tratamento com docetaxel. Esses genes apresentaram perfis de expressão interessantes nas células HB4a e C5.2, antes e após o tratamento com docetaxel, pelo SAGE, que foram confirmados por qPCR, e representam novos genes candidatos a participarem dos processos de tumorigênese e quimioresistência na mama.

O gene *MGC11242* (*ATAD4*) foi encontrado mais expresso nas células C5.2 comparadas às células HB4a, também, pela técnica de cDNA microarray (MACKAY et al. 2003). Esse gene apresentou um grande aumento de expressão nas células C5.2 em relação às células HB4a, antes e depois do tratamento com docetaxel, pelas análises de SAGE e qPCR.

O padrão de expressão gênica da maioria dos genes selecionados, obtido por qPCR, foi consistente com o encontrado pela técnica de SAGE, embora não tenha sido observada a mesma proporção nas diferenças. A expressão diferencial de quase todos os genes foi validada, embora para alguns, isso tenha ocorrido em parte das comparações realizadas.

Nesse trabalho, através da técnica de SAGE, foi identificado um grande número de genes ativados ou reprimidos pela expressão aumentada de *ERBB2*, na ausência de tratamento ou em resposta ao docetaxel. Entre esses genes identificados, estão incluídos muitos ainda desconhecidos, ou que não tiveram sua função elucidada. Todos os transcritos encontrados diferencialmente expressos na comparação das bibliotecas de SAGE das células HB4a e C5.2, antes e após o

tratamento com docetaxel, representam possíveis marcadores do desenvolvimento tumoral e/ou da quimioresistência a drogas. Entretanto, estudos experimentais e clínicos devem ser realizados até que seja confirmado o potencial desses genes como marcadores de resposta à quimioterapia em câncer de mama.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O uso da técnica de SAGE nos permitiu identificar um grande número de genes potencialmente regulados por *ERBB2*, que atuam em diversos processos celulares, como proliferação celular, apoptose, adesão celular e organização de citoesqueleto, e podem estar envolvidos no processo de tumorigênese.
- A comparação do transcriptoma das linhagens celulares HB4a e C5.2 antes e após o tratamento com docetaxel revelou diferenças substanciais no padrão de expressão gênica, permitindo a identificação de genes potencialmente associados a sensibilidade ou resistência aos taxanos.
- A maior parte dos genes selecionados na comparação das bibliotecas geradas por SAGE foi validada por qPCR, confirmando o potencial destes genes como possíveis marcadores de transformação celular e/ou resposta a quimioterapia.
- Nossos resultados de SAGE e qPCR, aliados aos dados de literatura, sugerem a participação de genes, tais como *SPARC*, *RUVBL1*, *TPM1* e *CENPH* na sensibilidade ou resistência ao docetaxel em células de mama.
- Um grande número de ESTs e transcritos ainda sem função definida foram identificados, principalmente nas células C5.2, quando comparadas às células HB4a, representando novos marcadores potenciais dos processos de transformação maligna e quimioresistência na mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrechek ER, Laing MA, Girgis-Gabardo AA, Siegel PM, Cardiff RD, Muller WJ. Gene expression profiling of neu-induced mammary tumors from transgenic mice reveals genetic and morphological similarities to ErbB2-expressing human breast cancers. **Cancer Res** 2003; 63:4920-6.

Bandyopadhyay S, Pai SK, Gross SC, et al. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. **Cancer Res** 2003; 63:1731-6.

Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, et al. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. **Oncogene** 2004a; 23:5675-81.

Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, et al. PTEN up-regulates the tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in prostate and breast cancer. **Cancer Res** 2004b; 64:7655-60.

Beckers J, Herrmann F, Rieger S, et al. Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. **Int J Cancer** 2005; 114:590-7.

Benz CC, Scott GK, Sarup JC, et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. **Breast Cancer Res Treat** 1993; 24:85-95.

Bertucci F, Borie N, Ginestier C, et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. **Oncogene** 2004; 23:2564-75.

Bièche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes Chromosom Cancer** 1995; 14:227-51.

Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. **J Clin Invest** 2001; 107:1049-54.

Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. **J Clin Invest** 2003; 111:487-95.

Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. **Oncogene** 2002; 21:7077-91.

Brown I, Shali K, McDonald SL, et al. Reduced expression of p27 is a novel mechanism of docetaxel resistance in breast cancer cells. **Breast Cancer Res** 2004; 6:R601-7.

Burriss HA 3rd. Single-agent Docetaxel (Taxotere) in randomized phase iii trials. **Semin Oncol** 1999; 26:1-6.

Cai C, Chen J. Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells. **Int J Cancer** 2004; 111:522-9.

Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. **BMC Genet** 2004; 5:27.

Carlson ML, Wilson ET, Prescott SM. Regulation of COX-2 transcription in a colon cancer cell line by Pontin52/TIP49a. **Mol Cancer** 2003; 2:42.

Chan S, Friedrichs K, Noel D, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. **J Clin Oncol** 1999; 17:2341-54.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. **Lancet** 2003; 362:362-9.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. **J Clin Oncol** 2005; 23:1169-77.

Chen JS, Lan K, Hung MC. Strategies to target HER2/neu overexpression for cancer therapy. **Drug Resist Updat** 2003; 6:129-36.

Chlenski A, Liu S, Guerrero LJ, et al. SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. **Int J Cancer** 2006; 118:310-6.

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

Ciardiello F, Caputo R, Pomatico G, et al. Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A. **Int J Cancer** 2000; 85:710-5.

Choudhury A, Charo J, Parapuram SK, et al. Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. **Int J Cancer** 2004; 108:71-7.

Christerson LB, Vanderbilt CA, Cobb MH. MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. **Cell Motil Cytoskeleton** 1999; 43:186-98.

Corjay MH, Kearney MA, Munzer DA, Diamond SM, Stoltenborg JK. Antiproliferative gene BTG1 is highly expressed in apoptotic cells in macrophage-rich areas of advanced lesions in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit and human. **Lab Invest** 1998; 78:847-58.

Crown J. Docetaxel: overview of an active drug for breast cancer. **Oncologist** 2001; 6:1-4.

Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell** 1997; 91:231-41.

Dhanesuan N, Sharp JA, Blick T, Price JT, Thompson EW. Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition. **Breast Cancer Res Treat** 2002; 75(1):73-85.

Dugan KA, Wood MA, Cole MD. TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. **Oncogene** 2002; 21:5835-43

Edlund M, Lotano MA, Otey CA. Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein. **Cell Motil Cytoskeleton** 2001; 48:190-200.

Feldner JC, Brandt BH. Cancer cell motility--on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. **Exp Cell Res** 2002; 272:93-108.

Feng Y, Lee N, Fearon ER. TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. **Cancer Res** 2003; 63:8726-34.

Fraley TS, Pereira CB, Tran TC, Singleton C, Greenwood JA. Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin dynamics: mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. **J Biol Chem** 2005; 280:15479-82.

Fukagawa T, Mikami Y, Nishihashi A, et al. CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells. **EMBO J** 2001; 20:4603-17.

Fulton B, Spencer CM. Docetaxel: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of metastatic breast cancer. **Drugs** 1996; 51:1075-92.

Gartner W, Rossbacher J, Zierhut B, et al. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. **Cell Motil Cytoskeleton** 2003; 56:79-93.

Gelmon K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. **Lancet** 1994; 344:1267-72.

Gligorov J, Lotz JP. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. **Oncologist** 2004; 9:3-8.

Gluck U, Ben-Ze'ev A. Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. **J Cell Sci** 1994; 107:1773-82.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **EMBO J**. 1997; 16:1647-55.

Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:10578-82.

Hamilton A, Hortobagyi G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? **J Clin Oncol** 2005; 23:1760-75.

Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. New model of *erbB-2* over-expression in human mammary luminal epithelial cells. **Int J Cancer** 1999; 80: 477-84.

Herbst RS, Khuri FR. Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents. **Cancer Treat Rev** 2003; 29:407-15.

Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. **Exp Cell Res** 2003; 284:99-110.

Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/*neu*: A Review. **Semin Oncol** 1999; 26:51-9.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Ingvarsson S. Molecular genetics of breast cancer progression. **Seminars in Cancer Biol** 1999; 9:277-88.

Iwai K, Hirata K, Ishida T, et al. An anti-proliferative gene BTG1 regulates angiogenesis in vitro. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 316:628-35.

Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. **J Clin Oncol** 2005; 23:422-31.

Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. **Exp Cell Res** 1999; 248:30-43.

Jan Y, Matter M, Pai JT, et al. A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. **Cell** 2004; 116:751-62.

Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:10-30.

Jiang X, Kim HE, Shu H, et al. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. **Science** 2003; 299:223-6.

Kauraniemi P, Hautaniemi S, Autio R, et al. Effects of Herceptin treatment on global gene expression patterns in HER2-amplified and nonamplified breast cancer cell lines. **Oncogene** 2004; 23:1010-3.

Kim KT, Ongusaha PP, Hong YK, et al. Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent mitotic spindle checkpoint. **J Biol Chem** 2004; 279:38597-602.

Klopper E, Kristiansen G, Wild PJ, et al. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. **Int J Oncol** 2004; 25:641-9.

Koblinski JE, Kaplan-Singer BR, VanOsdol SJ, et al. Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis. **Cancer Res** 2005; 65:7370-7.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. **Cancer Res** 2003; 63:132-9.

Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. **Endocr Relat Cancer** 2004; 11:497-522.

Lacroix M, Leclercq G. The "portrait" of hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 89:297-304.

Landis MD, Seachrist DD, Montanez-Wiscovich ME, Danielpour D, Keri RA. Gene expression profiling of cancer progression reveals intrinsic regulation of transforming growth factor-beta signaling in ErbB2/Neu-induced tumors from transgenic mice. **Oncogene** 2005; 24:5173-90.

Liu C, Shi Y, Du Y, et al. Dual-specificity phosphatase DUSP1 protects overactivation of hypoxia-inducible factor 1 through inactivating ERK MAPK. **Exp Cell Res** 2005; 309:410-8.

Mackay A, Jones C, Dexter T, et al. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. **Oncogene** 2003; 22:2680-8.

Mahadev K, Raval G, Bharadwaj S, et al. Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1. **Exp Cell Res** 2002; 279:40-51.

Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 58:903-13.

Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92: 1126-35.

Matilla A, Radrizzani M. The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. **Cerebellum** 2005; 4:7-18.

McDonald SL, Stevenson DA, Moir SE, et al. Genomic changes identified by comparative genomic hybridisation in docetaxel-resistant breast cancer cell lines. **Eur J Cancer** 2005; 41:1086-94.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas/2006: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Nabholtz JM. Docetaxel (Taxotere) plus Doxorubicin-based combinations: the evidence of activity in breast cancer. **Semin Oncol** 1999; 26:7-13.

Nabholtz JM, Reese DM, Lindsay MA, Riva A. Docetaxel in the treatment of breast cancer: an update on recent studies. **Semin Oncol** 2002; 29:28-34.

Nabholtz JM, Gligorov J. Docetaxel/trastuzumab combination therapy for the treatment of breast cancer. **Expert Opin Pharmacother** 2005; 6:1555-64.

Nagai MA, Marques LA, Torloni H, Brentani MM. Genetic alterations in *c-erbB-2* protooncogene as prognostic markers in human primary breast tumors. **Oncology** 1993; 50: 412-7.

Nikolopoulos SN, Spengler BA, Kisselbach K, Evans AE, Biedler JL, Ross RA. The human non-muscle alpha-actinin protein encoded by the ACTN4 gene suppresses tumorigenicity of human neuroblastoma cells. **Oncogene** 2000; 19:380-6.

Olsen RK, Andresen BS, Christensen E, Bross P, Skovby F, Gregersen N. Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. **Hum Mutat** 2003; 22:12-23.

Orr MS, O'Connor PM, Kohn, KW. Effects of *c-erbB2* overexpression on the drug sensitivities of normal human mammary epithelial cells. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92: 987-93.

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

Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. **Curr Opin Genet Dev** 2001; 11:41-7.

Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. **Oncogene** 1997; 15:537-47.

Prasad GL, Fuldner RA, Cooper HL. Expression of transduced tropomyosin 1 cDNA suppresses neoplastic growth of cells transformed by the ras oncogene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:7039-43.

Pusztai L, Esteva FJ, Cristofanilli M, Hung MC, Hortobagyi GN. Chemo-signal therapy, an emerging new approach to modify drug resistance in breast cancer. **Cancer Treat Rev** 1999; 25:271-7.

Rabindran SK. Antitumor activity of HER-2 inhibitors. **Cancer Lett** 2005; 227:9-23.

Raval GN, Bharadwaj S, Levine EA, et al. Loss of expression of tropomyosin-1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. **Oncogene** 2003; 22:6194-203.

Ravdin, PM. Should HER2 status be routinely measured for all breast cancer patients? **Semin Oncol** 1999a; 26:117-23.

Ravdin PM. Emerging role of docetaxel (Taxotere) in the adjuvant therapy of breast cancer. **Semin Oncol** 1999b; 3:20-3.

Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 319:1-11.

Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. **Stem Cells** 1998; 16:413-28.

Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, et al. BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. **EMBO J** 1992; 11:1663-70.

Sasa M, Kondo K, Komaki K, Morimoto T, Monden Y. p53 alteration correlates with negative ER, negative PgR, and high histologic grade in breast cancer. **J Surg Oncol** 1994; 56:46-50.

Scott K, Weinberg C. Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. **Glycoconj J** 2004; 19:467-77.

Shah MA, Kemeny N, Hummer A, et al. Drg1 expression in 131 colorectal liver metastases: correlation with clinical variables and patient outcomes. **Clin Cancer Res** 2005; 11:3296-302.

Shalli K, Brown I, Heys SD, Schofield AC. Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. **FASEB J** 2005; 19:1299-301.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. **Science** 1987; 235:177-82.

Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. **Mol Pharmacol** 2004; 66:1478-90.

Soti C, Csermely P. Molecular chaperones in the etiology and therapy of cancer. **Pathol Oncol Res** 1998; 4:316-21.

Stamps AC, Davies SC, Burman J, O'Hare MJ. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int J Cancer** 1994; 57:865-74.

Stein S, Thomas EK, Herzog B, et al. NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. **J Biol Chem** 2004; 279:48930-40.

Sugata N, Li S, Earnshaw WC, et al. Human CENP-H multimers colocalize with CENP-A and CENP-C at active centromere--kinetochore complexes. **Hum Mol Genet** 2000; 9:2919-26.

Tai IT, Dai M, Owen DA, Chen LB. Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. **J Clin Invest** 2005; 115:1492-502.

Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. **N Engl J Med** 1995; 332:1393-8.

Timms JF, White SL, O'Hare MJ, Waterfield MD. Effects of *erbB-2* overexpression on mitogenic signaling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. **Oncogene** 2002; 21: 6573-86.

Tomonaga T, Matsushita K, Ishibashi M, et al. Centromere protein H is up-regulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. **Cancer Res** 2005; 65:4683-9.

Ueno NT, Yu D, Hung MC. Chemosensitization of HER-2/neu-overexpressing human breast cancer cells to paclitaxel (Taxol) by adenovirus type 5 *E1A*. **Oncogene** 1997; 15: 953-60.

Ugolini F, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ, et al. WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. **Oncogene** 2001; 20:5810-7.

van den Brule F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. **Glycoconj J** 2004; 19:537-42.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. **Science** 1995; 270:484-7, 1995.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:489-501.

Watkins G, Douglas-Jones A, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 2005; 72:267-72.

White SL, Gharbi S, Bertani MF, Chan HL, Waterfield MD, Timms JF. Cellular responses to ErbB-2 overexpression in human mammary luminal epithelial cells: comparison of mRNA and protein expression. **Br J Cancer** 2004; 90:173-81.

Wiest I, Seliger C, Walzel H, Friese K, Jeschke U. Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-1. **Anticancer Res** 2005; 25:1575-80.

Wilson KS, Roberts H, Leek R, Harris AL, Geradts J. Differential gene expression patterns in HER2/neu-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues. **Am J Pathol** 2002; 161:1171-85.

Wood MA, McMahon SB, Cole MD. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. **Mol Cell** 2000; 5:321-30.

Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. **J Biol Chem** 2005; 280:4117-24.

Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. **J Histochem Cytochem** 1999; 47:1495-506.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:127-37.

Yoshida NL, Miyashita T, M U, et al. Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 293:1254-61.

Yu D, Liu B, Jing T, et al. Overexpression of both p185c-*erbB2* and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. **Oncogene** 1998; 16: 2087-94.

Yu D, Hung MC. Role of *erbB2* in breast cancer chemosensitivity. **Bioessays** 2000; 22:673-80.

Zhang R, Luo D, Miao R, et al. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. **Oncogene** 2005; 24:3954-63.

Zhou BP, Hung MC. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. **Semin Oncol** 2003; 30:38-48.

Zhu H, Cai C, Chen J. Suppression of P-glycoprotein gene expression in Hs578T/Dox by the overexpression of caveolin-1. **FEBS Lett** 2004; 576:369-74.

ANEXOS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)