

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA E BIOQUÍMICA**

CARYNE MARGOTTO BERTOLLO

**MECANISMOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELA RADIAÇÃO γ E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
NAS NOVAS LINHAGENS DE CÂNCER MAMA
HUMANO MACL-1 E MGSO-3**

Belo Horizonte

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CARYNE MARGOTTO BERTOLLO

**MECANISMOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELA RADIAÇÃO γ E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
NAS NOVAS LINHAGENS DE CÂNCER MAMA
HUMANO MACL-1 E MGSO-3**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Alfredo Miranda Góes

Co-orientador: Adriano Monteiro de Castro Pimenta

**Belo Horizonte
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
2010**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Dr. Alfredo Miranda Góes e co-orientação do Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta.

APOIO FINANCEIRO:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

COLABORADORES:

- Dr. Agenor Valadares
- Dra. Cristiane Rodrigues Correa
- Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes
- Dra. Héliida Andrade
- Dr. Mário da Silva Giusta

Ao Giovanni e à Suellem, com saudades impossíveis.

*“Agora está tão longe/ ver a linha do horizonte me distrai/
Dos nossos planos é que tenho mais saudade/
Quando olhávamos juntos/ Na mesma direção/
Aonde está você agora/ Além de aqui dentro de mim.../
Agimos certo sem querer/ Foi só o tempo que errou/
Vai ser difícil sem você/ Porque você está comigo/ O tempo todo.”*

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força.

Ao prof. Alfredo, por seus ensinamentos e por sua humanidade.

Ao prof. Adriano pela oportunidade e colaboração.

Às professoras Elaine e Héliida por dividirem seus conhecimentos, idéias e materiais.

Ao prof. Dawidson e todos os integrantes de seu laboratório, pela parceria.

À Cris, por ter me mostrado que eu sou capaz de realizar muito mais do que eu imaginava.

Às colegas do LICM, pelo companheirismo e pelos ensinamentos. Betinha, Cíntia, Alessandra, Carol, Débora, Elis, Estefânia, Luara, Luiza, Jankerle, Ju Lott, Ju Barbosa, Marina, Naira, Natássia, Natalia, Priscilla, Patrícia, Paula, Silviene, Suzana, Vivi Cristina, Vivi Gomide, etc.

Ao Mário e ao Agenor, pela paciência e pela ajuda em tantos experimentos.

À Tati e à Érica, pela indispensável ajuda no FACS.

Aos colaboradores do LIG-CDTN, Ferracine, Perpétua, Pablo, Márcio e Timóteo, pelo auxílio nas irradiações.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Aos professores do curso de Farmácia da UFMG.

Aos amigos do Laboratório de Farmacodinâmica: Prof. Márcio Coelho, Prof. Antônio Carlos, Profa. Karina, Prof. Elias, Prof. Leonardo e Profa. Adriana, por tudo o que representaram e representam na minha vida profissional e pessoal.

À minha querida mãe, uma mulher feita de flores e de aço.

Ao meu pai, pelo apoio e confiança.

Ao Rossano e à Luciana. Dizem que amigos são os familiares que podemos escolher. Se eu precisasse escolher minha família, certamente teria escolhido vocês! Obrigada por todos os momentos de imensa alegria! E, também, pela companhia nos momentos complicados!

À linda Laura, que mostrou tão rápido que recomeçar é possível.

Ao Giovanni, pelo exemplo de dedicação e competência. A sua presença na minha vida sempre foi indispensável.

À Suellem, por ter me ensinado a valorizar o poder de sonhar. Onde quer que esteja você continua vivendo em nossos sonhos.

Ao Alisson, obrigada por existir e estar em minha vida.

À família Luzia, pelo carinho e por terem me recebido.

À Tula, ao Haynner e a Geovana, por terem ficado por perto.

Aos Margottos e Bertollos, pela ajuda indispensável para a conclusão desse trabalho.

*Donde concluo que um dos ofícios do homem é fechar
e apertar muito os olhos a ver se continua pela noite
velha o sonho truncado da noite moça.*

Machado de Assis

RESUMO

O câncer representa uma das principais causas de morte em todo o mundo. Estima-se que em 2008 7,6 milhões de pessoas morreram em consequência dessa condição patológica. No Brasil, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum e são esperados 49 mil novos casos em 2010. O diagnóstico e o tratamento desse tipo de câncer permanecem como desafios. A caracterização de novas linhagens celulares é uma ferramenta importante para a compreensão dos processos biológicos envolvidos no câncer e as respostas induzidas pelos tratamentos disponíveis. No presente estudo foram usadas duas novas linhagens de células de câncer de mama humano estabelecidas a partir de fragmentos de tumor primário: MACL-1 e MGSO-3. A susceptibilidade dessas linhagens ao tratamento com radiação ionizante (RI) foi comparada com aquela da linhagem comercial MDA-MB-231, derivada de sítio de metástase. A RI (10 ou 20 Gy) induziu redução da viabilidade celular e morte, mensurada por meio do ensaio de fragmentação do DNA, 48 e 72 h após o tratamento. Além disso, após 48 h, foi observado aumento da porcentagem de células apoptóticas. O tratamento com 20 Gy reduziu, também, a sobrevivência clonogênica. Porém, quando mantidas em cultura após o tratamento com RI (20 Gy), as células das três linhagens recuperaram-se em 21 dias e a viabilidade celular dessas culturas foi semelhante àquela das culturas que não foram previamente expostas à radiação, sugerindo que apresentam fenótipo radorresistente. O inibidor de caspases zVAD-FMK inibiu a fragmentação do DNA e a redução de viabilidade celular induzidas pela RI, sugerindo o envolvimento de caspases na morte celular induzida pela RI. De fato, o tratamento com RI (20 Gy, 24 h) ativou caspase-9 nas linhagens MACL-1 e MDA-MB-231, mas não em MGSO-3. Além disso a RI (20 Gy, 30 h) induziu ativação das caspases 8 e 3 nas três linhagens usadas. Apesar de ter sido demonstrado que a RI induz citotoxicidade, não foi detectada alteração na expressão protéica, avaliada por eletroforese bidimensional, 24 ou 30 h após o tratamento de células da linhagem MDA-MB-231 com 20 Gy. Por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas foi demonstrado que existem diferenças no perfil de expressão protéica das linhagens MACL-1 e MGSO-3 em relação a células obtidas a partir de tecido de mama saudável. Em conjunto, esses resultados sugerem que as novas linhagens de câncer de mama humano MACL-1 e MGSO-3 podem ser úteis em estudos para compreender a radiobiologia do câncer de mama e contribuir para o desenvolvimento racional de modelos para o estudo do tratamento do câncer bem como para a identificação de marcadores para esse tipo de câncer.

PALAVRAS CHAVE: câncer de mama, linhagem celular, radiação ionizante, morte celular, apoptose, proteoma.

SUMMARY

Cancer represents a major cause of death worldwide. It is estimated that in 2008 7.6 million people died as a consequence of this disease. In Brazil, breast cancer is the second most common type of cancer and 49 000 new cases are expected in 2010. The diagnosis and treatment of this cancer remain as challenges. The characterization of new cell lines is an important tool to understand the biological processes involved in cancer treatments. In the present study we used two newly established epithelial human breast cancer cell lines from primary sites MACL-1 and MGSO-3 and compared their susceptibility to the treatment with ionizing radiation (IR) with the commercial cell line MDA-MB-231. In the doses used (10 or 20 Gy), IR induced a reduction in cell viability and cell death, measured as DNA fragmentation, at 48 and 72 h after treatment. In addition, 48 h after treatment with IR we observed an enhancement in the percentage of apoptotic cells. The broad-range caspases inhibitor zVAD-FMK inhibited IR cytotoxicity, suggesting the involvement of caspases in cell death induced by this treatment. After 24h, treatment with IR activated caspase-9 in MACL-1 and MDA-MB-231 but not in MGSO-3 cells. Thirty hours after treatment with IR (20 Gy), we observed an activation of caspases 8 and 3. Although it was shown that IR induces cytotoxicity no alterations were detected in protein expression, assessed by two-dimensional electrophoresis, 24 or 30 h after treatment of MDA-MB-231 with 20 Gy. Through two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry it was shown that there are differences in protein expression profile of strains MACL-1 and MGSO-3 when compared to cells obtained from healthy breast tissue. Together, these results suggest that the newly established human breast cancer cell lines, MACL-1 and MGSO-3, may be useful in studies of breast cancer in defining basic mechanisms in molecular and cellular radiobiology and may contribute to the rational design of future models of cancer therapies as well as the identification of markers for this type of cancer.

KEY WORDS: breast cancer, cell line, ionizing radiation, cell death, apoptosis, proteome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais mecanismos envolvidos na oncogênese.....	23
Figura 2	Representação esquemática da enzima telomerase.....	24
Figura 3	Representação esquemática da anatomia da mama.....	26
Figura 4	Representação esquemática do ciclo celular e dos pontos de verificação na transição entre diferentes fases.....	29
Figura 5	Representação esquemática das fases da mitose.....	30
Figura 6	Representação esquemática das vias de ativação de caspases durante a apoptose.....	33
Figura 7	Representação esquemática das alterações morfológicas características dos diferentes tipos de morte celular.....	37
Figura 8	Representação esquemática do fluxo de informação dos genes para a função.....	38
Figura 9	Aspecto morfológico ao microscópio óptico das células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231.....	43
Figura 10	Visualização das colônias formadas a partir do plaqueamento de células de câncer de mama não irradiadas nas densidades de 100, 200 e 300 células em placas de 6 poços.....	46
Figura 11	Histograma representativo da análise do conteúdo de DNA subdiploide.....	49
Figura 12	Efeito induzido pela RI (10 ou 20 Gy) sobre a metabolização de MTT pelas células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231.....	61
Figura 13	Imagens representativas da formação de colônias das linhagens de câncer de mama MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 10 dias após o tratamento com RI (10 ou 20 Gy).....	62
Figura 14	Efeito induzido pela RI (10 ou 20 Gy) sobre a sobrevivência clonogênica das células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231..	63
Figura 15	Efeito induzido pela RI (10 ou 20 Gy) sobre a metabolização de MTT pelas células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 controle e recuperadas.....	64

Figura 16	Perfil de células da linhagem MACL-1 em mitose.....	65
Figura 17	Imagens representativas de células da linhagem MACL-1 em diferentes fases do ciclo celular.....	66
Figura 18	Distribuição da população de células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 coradas com iodeto de propídeo 24 horas após tratamento com RI (10 ou 20 Gy).....	67
Figura 19	Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a porcentagem de células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 em mitose 24 horas após o tratamento.....	68
Figura 20	Imagens representativas de células da linhagem MACL-1 em diferentes fases do ciclo celular 24 horas após o tratamento com RI (20 Gy).....	68
Figura 21	Distribuição da população de células MACL-1 coradas com iodeto de propídeo 48 e 72 horas após tratamento com RI (10 ou 20 Gy).....	69
Figura 22	Distribuição da população de células MGSO-3 coradas com iodeto de propídeo 48 e 72 horas após tratamento com RI (10 ou 20 Gy).	70
Figura 23	Distribuição da população de células MDA-MB-231 coradas com iodeto de propídeo 48 e 72 horas após tratamento com RI (10 ou 20 Gy).	70
Figura 24	Fragmentação do DNA em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 induzida pela RI (10 ou 20 Gy).....	71
Figura 25	Exposição de fosfatidilserina em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 48 horas após o tratamento com RI (20 Gy).....	73
Figura 26	Efeito induzido pela RI (20 Gy, 48 h) sobre a metabolização de MTT pelas células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 na ausência ou presença de um inibidor de caspases (80 μ M, 1h).....	74
Figura 27	Fragmentação do DNA em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 induzida pela RI (20 Gy, 48 h) na ausência ou presença de um inibidor de caspases (80 μ M, 1h).....	75

Figura 28	Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a atividade de caspase 8 em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 24 e 30 horas após o tratamento.....	76
Figura 29	Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a atividade de caspase 9 em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 24 e 30 horas após o tratamento.....	77
Figura 30	Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a atividade de caspase 3 em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 30 horas após o tratamento.....	78
Figura 31	Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231 controle (Cy 3) e tratado (Cy 5; 20 Gy, 24h) obtido por 2D-DIGE.....	79
Figura 32	Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231 controle (Cy 5) e tratado (Cy 3; 20 Gy, 24h) obtido por 2D-DIGE.....	79
Figura 33	Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231.....	80
Figura 34	Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231 obtido 30 horas após o tratamento com RI (20 Gy).....	80
Figura 35	Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MACL-1 (Cy5) e células saudáveis (Cy3) obtido por 2D-DIGE.....	82
Figura 36	Gráfico de tendência, imagem do spot e gráfico tridimensional da proteína galectina 1 que teve expressão aumentada nas células MACL-1.....	84
Figura 37	Gráfico de tendência, imagem do spot e gráfico tridimensional da proteína anexina V que teve expressão reduzida nas células MACL-1.....	85
Figura 38	Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MGSO-3 (Cy3) e células saudáveis (Cy5) obtido por 2D-DIGE.....	86

Figura 39 Gráfico de tendência, imagem do spot e gráfico tridimensional da proteína HSP 27 que teve expressão aumentada nas células MGSO-3..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Coloração de amostras protéicas usadas nos géis 2D-DIGE para comparação da expressão protéica de células MDA-MB-231 controle e tratadas com 20 Gy.....	55
Tabela 2	Coloração de amostras protéicas usadas nos géis 2D-DIGE para comparação da expressão protéica de células saudáveis e das linhagens MACL-1 e MGSO-3.....	55
Tabela 3	Programa de focalização para tiras de Immobiline Drystrip Gel de 13 e 18 cm na unidade de focalização isoelétrica Ettan IPGphor II.....	56
Tabela 4	Proteínas identificadas com expressão diferente entre células MACL-1 e de tecido de mama saudável.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Eletroforese bidimensional
2D-DIGE	Eletroforese bidimensional diferencial por fluorescência
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica (Apoptotic protease activating factor 1)
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Proteína cinase mutada de Ataxia telangiectasia (Ataxia telangiectasia-mutated protein kinase)
ATP	Trifosfato de adenosina
BAK	Bcl-2 antagonist/killer-1
BAX	Proteína X associada a Bcl-2 (Bcl-2 associated X protein)
BCL	Proteína de leucemia de célula B (B cell leukemia protein)
BID	BH3 domain-only death agonist protein
BRCA	Proteína supressora de crescimento de câncer de mama (breast cancer growth supressor protein)
BSA	Albumina bovina
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
Chk	Cinase de ponto de verificação (checkpoint kinase)
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
Fas	Receptor da superfamília do TNF (TNF superfamily receptor 6)
FADD	Domínio de morte associado a Fas (Fas associated death domain)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Fração de sobrevivência
Gy	Grays
HCl	Ácido clorídrico
HER-2	Fator de crescimento epidermal
HFS	Solução fluorocrômica hipotônica
HSP	Proteína de choque térmico (heat shock protein)

H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MALDI	Dessorção/ionização a laser assistida por matriz (matrix assisted laser desorption/ionization)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase)
MTT	Metiltiazoltetrazólio
MUC-1	Mucina 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PE	Eficiência de plaqueamento
PI	Iodeto de propídeo
RI	Radiação ionizante
RIP	Proteína que interage com receptor de morte (receptor-interacting protein)
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral
TOF	Tempo de vôo (time of flight)
TRAIL	Ligante inductor de apoptose relacionado ao TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
Zvad	Z-Val-Ala-Asp(OCH ₃)-fluorometilcetona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVO.....	41
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
2.3	Justificativa.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	Linhagens celulares.....	43
3.2	Cultura celular.....	43
3.3	Tratamento das células com radiação γ	44
3.4	Avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT).....	44
3.5	Ensaio de clonogenicidade.....	45
3.6	Recuperação de células após a irradiação.....	47
3.7	Determinação do conteúdo de DNA subdiploide por citometria de fluxo	48
3.8	Determinação do índice mitótico.....	49
3.9	Ensaio de dupla coloração com anexina V-FITC e PI.....	51
3.10	Tratamento com inibidor de caspases.....	51
3.11	Ensaio de ativação de caspases 8 e 9.....	52
3.12	Detecção de caspase 3 ativa por citometria de fluxo.....	52
3.13	Cultura de células de tecido de mama saudável.....	53
3.14	Eletroforese bidimensional.....	53
3.14.1	Extração de proteínas.....	53

3.14.2	Marcação de proteínas para eletroforese bidimensional diferencial por fluorescência (2D-DIGE).....	54
3.14.3	Focalização isoeétrica.....	55
3.14.4	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	56
3.14.5	Detecção de proteínas e análise dos géis bidimensionais.....	57
3.14.6	Digestão trípica em gel bidimensional.....	58
3.14.7	Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....	58
3.15	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS.....	60
4.1	Citotoxicidade induzida pela radiação γ nas linhagens de células de câncer de mama.....	60
4.2	Recuperação das linhagens após tratamento com radiação γ	63
4.3	Bloqueio do ciclo celular induzido pela radiação γ	65
4.4	Fragmentação do DNA induzida pela radiação γ	69
4.5	Exposição de fosfatidilserina induzida pela radiação γ	72
4.6	Envolvimento de caspases nos efeitos induzidos pela radiação γ	74
4.7	Avaliação da expressão protéica por eletroforese bidimensional após tratamento com radiação γ	78
4.8	Análise comparativa do perfil de expressão protéica de células de tecido de mama saudável e das linhagens MACL-1 e MGSO-3.....	81
5	DISCUSSÃO.....	88
6	CONCLUSÃO.....	102
7	PERSPECTIVAS.....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

ANEXO A – RELATÓRIO DE EXAME ANATOMOPATOLÓGICO MACL-1.....	126
ANEXO B – RELATÓRIO DE EXAME ANATOMOPATOLÓGICO MGSO-3.....	127
ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO.....	128

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma condição patológica que atinge milhares de indivíduos a cada ano e que aflige a espécie humana desde tempos remotos. O primeiro relato de câncer foi descoberto em um papiro egípcio de 1600 a.C. em que estão descritos oito casos de tumores no seio para os quais não havia tratamento. A origem do termo câncer é atribuída ao médico grego Hipócrates, em 400 a.C., que denominou certos tumores de carcinomas, devido à semelhança dos vasos sanguíneos desses tumores com o formato das patas de caranguejos. Câncer, a palavra latina para caranguejo, foi um termo introduzido pelo médico romano Celsus e o termo oncos, palavra grega para tumor, foi associado ao câncer por outro médico romano, Galeno (The history of cancer, 2010).

A oncologia como ciência surgiu em 1761, com os estudos de Giovanni Morgagni de Padua os quais relacionavam a doença dos indivíduos a achados patológicos após a morte. Nessa mesma época, o cirurgião escocês John Hunter sugeriu que alguns tipos de câncer poderiam ser tratados por remoção cirúrgica do tumor, o que se tornou um procedimento corriqueiro cerca de um século depois, com o surgimento da anestesia (The history of cancer, 2010). Em 1952, o oncologista britânico Willis definiu o câncer como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com o dos tecidos saudáveis e persiste na mesma maneira excessiva depois da interrupção dos estímulos que deram origem à mudança (Willis, 1952).

Apesar do volume de estudos que abordam o câncer, a compreensão dos mecanismos responsáveis pelo estabelecimento dessa condição patológica continua incompleta. Diferentes teorias tentam explicar o surgimento de células neoplásicas e o desenvolvimento do tumor. Uma delas, a teoria da evolução clonal, tem sido amplamente discutida e defende que o surgimento do câncer é análogo a um processo de evolução darwiniana. Nesse processo, células somáticas adquirem

mutações aleatoriamente e os fenótipos resultantes são gradualmente selecionados. Alguns desses fenótipos são deletérios e as células com a mutação morrem. Por outro lado, certas mutações conferem à célula maior capacidade de proliferar e sobreviver em condições pouco favoráveis. Ocasionalmente, uma célula adquire mutações suficientemente vantajosas que conferem capacidade invasiva às células tumorais e permitem sua multiplicação mais intensa em relação às demais células do tecido. O conjunto dessas e outras alterações resulta na formação de uma neoplasia (Stratton *et al*, 2009).

Sabe-se que a relação entre alterações no genoma e o surgimento do câncer foi descrita entre o final do século 19 e o início do século 20 por David Von Hansemann e Theodor Boveri. Em seus estudos, esses pesquisadores observaram a presença de aberrações cromossômicas em células tumorais. Mais tarde, foi demonstrado que agentes mutagênicos e que causam danos no DNA também causam câncer. Por fim, a importância do genoma foi demonstrada pela conversão de células de fenótipo normal em células cancerígenas por meio da introdução do DNA genômico de células tumorais em células normais (Krontiris, Cooper, 1981; Shih *et al*, 1981). Atualmente, estudos demonstram que o tipo e o número total de mutações que podem ser observadas em diferentes tumores são bastante amplos podendo variar de 1.000 a 100.000 (Stratton *et al*, 2009).

Apesar de as alterações genéticas serem bastante freqüentes em carcinomas, existem questionamentos sobre o conceito de que seriam as únicas responsáveis pelo surgimento das neoplasias. Outra teoria visa explicar a formação de tumores e sua resistência aos tratamentos clínicos baseada na existência de uma população de células tronco tumorais. Elas representariam uma sub-população de células iniciadoras que dariam origem às células mais diferenciadas da massa tumoral (Wicha *et al*, 2006). Por terem a capacidade de se auto-renovar e por serem pouco diferenciadas, as células tronco tumorais podem dar origem a diferentes tipos celulares. Essas células são resistentes à apoptose e, portanto, apresentam maior resistência às terapias convencionais (Gil *et al*, 2008). De fato, existem estudos que demonstram a existência de células com características de células tronco em tumores de mama (Al-Hajj *et al*, 2003), cabeça e pescoço (Prince *et al*, 2007) e

pâncreas (Li *et al*, 2007), entre outros (Harper *et al*, 2010). Porém, os vários tipos de câncer podem ter seu surgimento atribuído a causas distintas e complementares e apresentam fatores de risco variados. Além disso, apresentam frequência e distribuição desigual na população e, independente dos mecanismos responsáveis por sua formação, consistem em uma condição patológica complexa que pode afetar diversos tecidos e órgãos.

Atualmente, o termo câncer refere-se a mais de 100 tipos de doenças (Stratton *et al*, 2009). Até 2008, a Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer, órgão ligado à Organização Mundial de Saúde (OMS), relacionou cerca de 100 fatores físicos, químicos e biológicos como carcinogênicos. Entre os fatores físicos, a exposição à radiação ultravioleta está associada, por exemplo, ao desenvolvimento de câncer de pele (Massari *et al*, 2007). Asbestos, hidrocarbonetos aromáticos e tabaco representam importantes fatores químicos de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão (Veglia *et al*, 2007). Além de fatores ambientais, que são responsáveis por cerca de 95% dos carcinomas, fatores genéticos estão associados a 5% dos cânceres em humanos (Sonnenschein, Soto, 2008). Nesses casos, alterações genéticas hereditárias favorecem o surgimento de neoplasias. Como exemplo, mutações nos genes BRCA-1 e 2 aumentam a susceptibilidade aos cânceres de mama e ovário (Lynch *et al*, 2008). Por sua vez, a translocação entre os cromossomos 9 e 22, está relacionada a um tipo específico de câncer, a leucemia mielóide crônica (Nowell, Hungerford, 1960).

Essas alterações genéticas presentes em neoplasias resultam em diferentes graus de alteração fenotípica (Figura 1). Como exemplo, pode haver aumento da expressão de receptores para fatores de crescimento (Adriaenssens *et al*, 2008; Dawood *et al*, 2008), favorecendo a proliferação celular. Dois membros da família do receptor de fator de crescimento epidermal (EGF ou HER) tiveram sua superexpressão descrita em diferentes tipos de câncer. O EGFR está superexpresso em até 80% dos tumores de cabeça e pescoço e de células escamosas do pulmão (Kumar *et al*, 2005, p.281) enquanto o HER-2 está amplificado em aproximadamente 25% dos carcinomas de mama (Hayes, Thor, 2002).

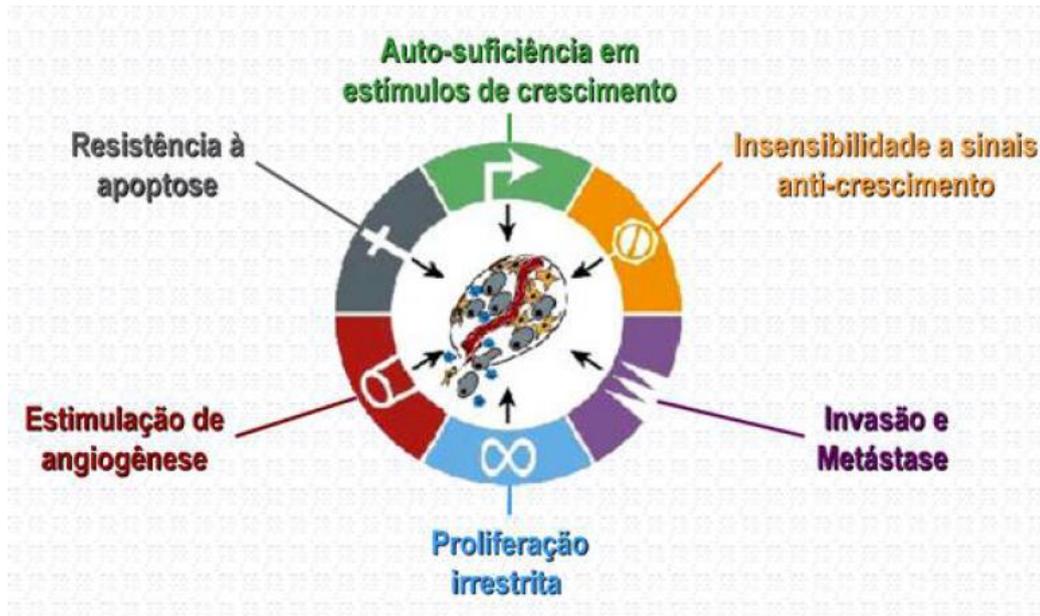


Figura 1 – Principais mecanismos envolvidos na oncogênese. Modificado de Hanahan e Weinberg (2000).

Outra alteração fenotípica importante em células tumorais é a redução da apoptose (Wendt *et al*, 2006; Toillon *et al*, 2007) e o desenvolvimento de mecanismos que tornam possíveis a sobrevivência e a proliferação de células com DNA danificado. No câncer de mama, por exemplo, genes associados a apoptose, entre eles BRCA-1 e BRCA-2 podem estar mutados. Além disso, inúmeras proteínas reguladoras da apoptose tem a expressão alterada, o que também resulta em desregulação do controle da morte celular programada (Di Pietro *et al*, 2009).

Também é comum ocorrer reativação da enzima telomerase (Yano *et al*, 2002; Ernst *et al*, 2006; Calcagnile, Gisselsson, 2007), uma transcriptase reversa responsável pela adição de seqüências TTAGGG à extremidade 3' do DNA formando os telômeros (Figura 2). A principal função dos telômeros é proteger a porção terminal dos cromossomos prevenindo a fusão dos mesmos e a degradação de regiões codificadoras (De Lange, 2005). A cada divisão celular, uma parte do telômero é perdida uma vez que a DNA polimerase não é capaz de copiar a porção terminal dos cromossomos. À medida que divisões celulares se sucedem há encurtamento dos telômeros nas células somáticas que não possuem a telomerase ativa (Harley *et al*, 1990) e as células param de se dividir indefinidamente. A reativação da telomerase

em células de neoplasias previne o encurtamento dos telômeros e, conseqüentemente a senescência replicativa e a apoptose que resultam da intensa proliferação dessas células (Hahn *et al*, 1999).

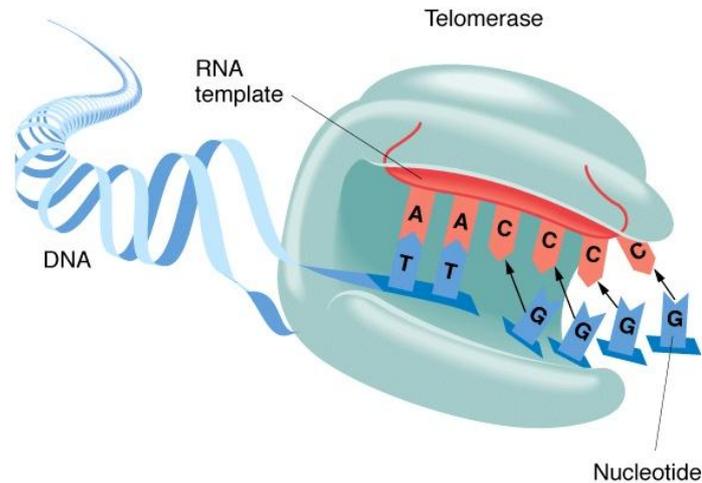


Figura 2 – Representação esquemática da enzima telomerase evidenciando o molde de RNA necessário para a síntese dos telômeros na extremidade do DNA.

Além de se dividir intensamente, as células de câncer podem ter capacidade invasiva e formar metástases. Uma vez que adquirem essa habilidade, as células cancerígenas atingem a circulação linfática e sanguínea e se estabelecem em tecidos distintos daquele de origem, dando início a novos tumores (Hanahan, Weinberg, 2000). Sabe-se que alterações na expressão de moléculas de adesão célula-célula desempenham papel importante na invasividade de células tumorais (Johnson, 1991).

Nesse aspecto, a ativação de um programa gênico de transição epitelial-mesenquimal é apontada como grande facilitadora da metástase. Alguns reguladores de transcrição, entre eles SNAI1 e SNAI2, inibem a expressão de genes que codificam proteínas epiteliais: citoqueratinas, E-caderina, β -catenina entre outras. Concomitantemente, induzem a expressão de vimentina e N-caderina, características de células mesenquimais (Thiery, Sleeman, 2006). Estudos têm sido realizados com o objetivo de ampliar os conhecimentos a respeito das metástases (Gupta *et al*, 2007; Minn *et al*, 2007; Gjerdrum *et al*, 2010) uma vez que as mesmas

estão relacionadas a grande parte das mortes de pacientes com câncer (Hanahan, Weinberg, 2000; Gupta *et al*, 2005).

Esse amplo conjunto de dados obtidos a partir de avaliações experimentais e clínicas demonstram que, de forma geral, as células de câncer apresentam defeitos em vias de regulação de proliferação celular e homeostase. Entretanto, apesar dos rápidos avanços na pesquisa do câncer, essa condição patológica permanece como um grande desafio para os sistemas de saúde. Atualmente, o câncer representa uma das principais causas de morte em todo o mundo. De acordo com a OMS, cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram em consequência do câncer em 2008 e estima-se que os óbitos ultrapassem 11 milhões em 2030 (WCR_2008). No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), 17% dos óbitos registrados em 2007 tiveram como causa o câncer. Esse percentual só foi superado pelas doenças que afetam o aparelho circulatório.

Dentre os diferentes tipos de câncer, aquele com maior número de casos previstos no Brasil é o câncer de pele não-melanoma (114 mil casos em 2010). Nas mulheres, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum e estima-se que em 2010 sejam registrados 49 mil novos casos, cerca de 10% de todos os casos de câncer previstos para esse período no país (ESTIMATIVA, 2010). O câncer de mama afeta, principalmente, mulheres acima dos 40 anos (Mcpherson *et al*, 2000). Grande parte desses tumores se inicia no epitélio de revestimento dos ductos ou dos lóbulos, glândulas individualizadas separadas por tecido conjuntivo denso e constituídas por inúmeros ductos (figura 3) (Junqueira e Carneiro, 2008, p. 448). Quando o carcinoma de mama restringe-se à sua origem o câncer é considerado *in situ*. Por sua vez, o tumor de mama invasivo espalha-se no tecido adjacente, sendo que o grau de comprometimento está relacionado ao estágio da doença. Do ponto de vista clínico, podem ser identificadas diversas subclasses de câncer de mama com diferenças nas características histopatológicas, no padrão de organização celular e na expressão de receptores hormonais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2004). Esses fenótipos tumorais estão associados a fatores genéticos e epigenéticos (Dejeux *et al*, 2010). Também existem evidências de que podem ser determinados pelo tipo celular do qual o tumor deriva (Ince *et al*, 2007).

Apesar de ser considerado como um câncer de bom prognóstico, a mortalidade por câncer de mama continua elevada e a sobrevivência após cinco anos mantém-se reduzida (61% dos pacientes). Em parte, a dificuldade no controle desse tipo de câncer pode ser atribuída ao fato de muitas pacientes evitarem o acompanhamento médico. Isso porque a detecção do câncer de mama tem resultados devastadores na auto-estima da mulher e, frequentemente, é acompanhada por depressão, ansiedade e outras desordens psíquicas (Bish *et al*, 2005; Harbeck, Haidinger, 2007). Entretanto, os principais problemas no controle do câncer de mama são associados ao diagnóstico.

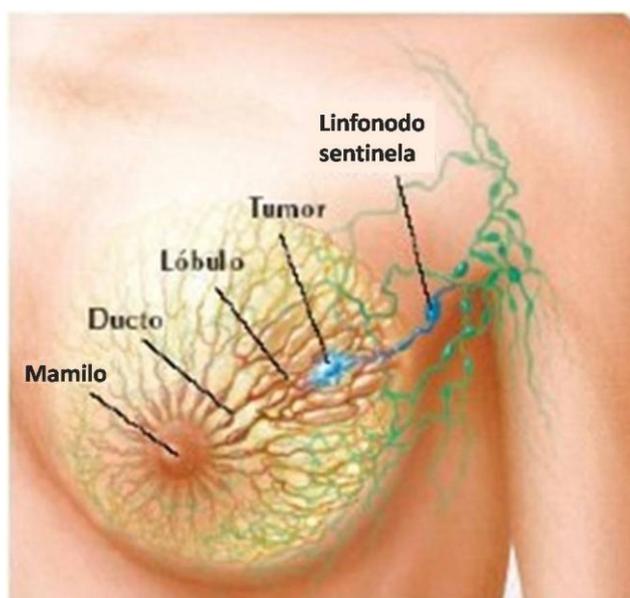


Figura 3 – Representação esquemática da anatomia da mama evidenciando os lóbulos e ductos que formam a glândula mamária e o linfonodo sentinela.

Atualmente, a abordagem anatomopatológica é a principal ferramenta usada para diagnosticar e classificar o câncer de mama. O Ministério da Saúde em parceria com o INCA publicou em 2004 um consenso que se baseia em documentos internacionais para definição de protocolos de diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com câncer de mama. De acordo com o consenso, o diagnóstico deve incluir a descrição de determinadas características do tumor como: tamanho, tipo e grau histológicos e invasão vascular peritumoral. Além disso, a identificação de linfonodos comprometidos e a avaliação do grau de comprometimento dos mesmos e das margens cirúrgicas de ressecção são

importantes para definição de diagnóstico e prognóstico (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2004).

Outra ferramenta de grande utilidade para auxiliar na classificação do câncer de mama é a investigação de marcadores moleculares. Esse tipo de análise concentra-se na dosagem de receptores de estrógeno e progesterona, sendo que o tumor é considerado positivo para esses marcadores quando mais de 1% das células expressam essas proteínas. Além disso, deve-se considerar a expressão de HER-2 na definição do tratamento (Abramovitz, Leyland-Jones, 2006).

Em conjunto, as informações obtidas com a avaliação histopatológica e a investigação de marcadores moleculares permitem classificar o tumor de mama e definir seu estadiamento. Assim, é possível estabelecer a modalidade terapêutica a ser usada com base no quadro de cada paciente (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2004). Uma das possibilidades de tratamento é a remoção cirúrgica do tumor. A paciente pode, também, ser submetida à radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal. O uso de quimioterapia ou radioterapia associada à cirurgia tem se tornado cada vez mais comum devido às crescentes evidências de que esse tipo de abordagem aumenta a sobrevivência e a sobrevida das pacientes. Além disso, a associação de quimioterápicos também tem se mostrado útil nos casos em que há metástases ou resistência a algum tipo de tratamento (Cox *et al*, 2006; Narayanan, Taylor, 2007; Chargari *et al*, 2009).

A quimioterapia do câncer de mama tem apresentado evoluções significativas nos últimos anos. Entre os fármacos mais amplamente usados no tratamento desse tipo de neoplasia, podem ser citados a doxorrubicina, a ciclofosfamida e os taxanos, como o paclitaxel (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2004; Seidman *et al*, 1995; Seidman *et al*, 2008). Entretanto, esses e outros quimioterápicos tradicionais apresentam mecanismos de ação inespecíficos, o que resulta na ocorrência de graves reações adversas. Como exemplo, pode-se citar os taxanos, que induzem seus efeitos por meio da estabilização de microtúbulos causando inibição da divisão celular. A ação dessas substâncias em células de tecidos saudáveis pode causar

neuropatia, estomatite, queratopatia e trombocitopenia (Ibrahim *et al*, 2002; Seidman *et al*, 2008), reações adversas graves que debilitam bastante a paciente.

Entretanto, estão disponíveis fármacos mais seguros e eficazes que interferem com alvos associados a fenótipos característicos de células tumorais como a expressão de receptores de hormônio (Lewis *et al*, 2010) ou para fator de crescimento (Cobleigh *et al*, 1999). Como exemplos desses tipos de quimioterápicos podem ser citados o trastuzumab e o pertuzumab, anticorpos monoclonais que se ligam ao HER-2, inativando-o. Estudos demonstram que cerca de 25% das neoplasias de mama superexpressam essa proteína (Hayes, Thor, 2002) a qual pode contribuir para um mau prognóstico (Sawaki *et al*, 2006). Quando associado ao paclitaxel, o trastuzumab reduz de forma significativa a evolução da doença e mesmo a terapia apenas com este fármaco é eficaz nos casos em que há superexpressão de HER-2. Por sua vez, o pertuzumab associado ao inibidor de tirosina quinase, erlotinib, é eficaz em modelos de diversos tipos de câncer independente da expressão de HER-2 (Hatake *et al*, 2007).

Apesar das evoluções na terapia do câncer de mama, o tratamento de pacientes com tumores que não podem ser completamente removidos ou de pacientes que apresentam alto risco de recorrência e metástases ainda representa um desafio. Por ser uma doença complexa e multifatorial, o tratamento do câncer de mama requer a associação de diferentes abordagens terapêuticas. Além da quimioterapia, a radioterapia é freqüentemente usada, sendo associada ou não a outras terapias (Dewar, 2006; Fayanju *et al*, 2007). A radioterapia baseia-se na exposição da parte do corpo afetada pelo tumor a uma fonte de raios γ ou X.

Essas radiações são ondas eletromagnéticas de alta energia. Ao interagir com a matéria, induzem ionização dos átomos e moléculas e, por essa razão, são denominadas radiações ionizantes (RI). Ao interagir com células e tecidos, a RI induz a formação de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, danificam, entre outras moléculas, o DNA (Mozdarani *et al*, 2007). Entre as alterações observadas no DNA, podem ser citadas trocas de bases e quebras simples e duplas. Os danos causados pela RI são mais intensos em células pouco diferenciadas, que

apresentam intenso metabolismo e alta taxa de proliferação. Assim, células tumorais seriam mais afetadas pela radioterapia do que células diferenciadas, conforme a lei de Bergonie e Tribondeau (1906). Os danos no DNA induzidos pela RI são detectados por proteínas nucleares que desencadeiam mecanismos de reparo. Os inúmeros mecanismos destinados à manutenção da estabilidade genômica asseguram a transmissão precisa da informação genética no seu fluxo até a síntese de proteínas (Lazzaro *et al*, 2009).

Além disso, uma vez que o DNA é a molécula responsável pela hereditariedade, sua integridade é indispensável para a formação de novas células. Portanto, quando as células tem o DNA danificado durante o processo de divisão celular, são ativadas vias de bloqueio do ciclo (Kao *et al*, 2001; Lazzaro *et al*, 2009). Dessa forma, evita-se a transferência de material genético danificado para células filhas. O controle do ciclo celular também é importante para evitar que o mesmo progrida antes de uma etapa ter sido concluída de forma adequada. Nos eucariotos, o ciclo celular é composto por quatro fases principais: G₁, S, G₂ e M e a transição entre elas é altamente regulada. As células que estão quiescentes se mantêm em um estado especial denominado G₀ (Figura 4). Quando a célula em G₀ recebe estímulo para se dividir, progride até G₁. Nessa fase, há síntese de proteínas necessárias para a fase S, durante a qual há duplicação do DNA. A célula prossegue, então, para a fase G₂ e, em seguida, para a mitose (fase M) (Alberts *et al*, 2004, p. 983).

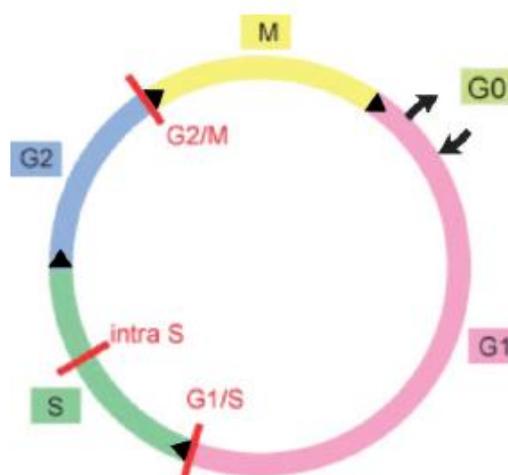


Figura 4 – Representação esquemática do ciclo celular e dos pontos de verificação na transição entre diferentes fases (traços vermelhos) (Fonte: Houtgraaf *et al*., 2006).

Apesar de ser considerada como uma fase da divisão celular, a mitose pode ser dividida em vários estágios (Figura 5). Na prófase os cromossomos, cada um composto por duas cromátides irmãs, sofrem intensa condensação em conjunto com proteínas cromossômicas e histonas. Durante a metáfase, feixes de proteínas do citoesqueleto promovem o alinhamento dos cromossomos em um plano central da célula para que as cromátides irmãs sejam separadas de forma organizada durante a anáfase. Em seguida, na telófase, observa-se a presença de cromossomos descondensados e o envelope nuclear é reconstruído antes do início da citocinese, etapa na qual o citoplasma é dividido e duas células filhas são formadas (Lodish *et al*, 2008, p. 847).

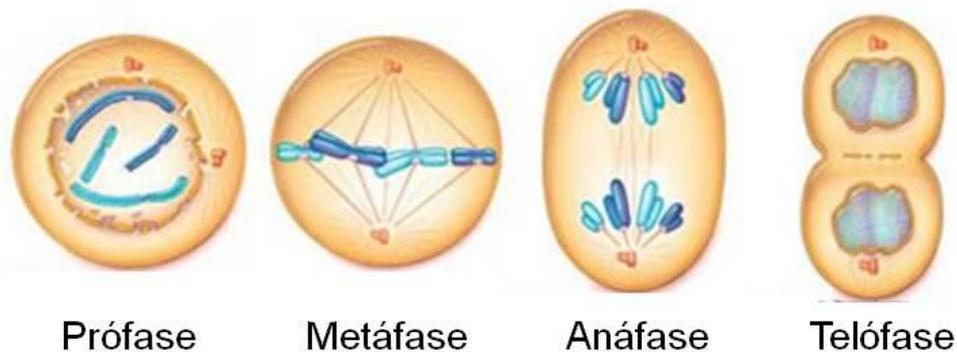


Figura 5 – Representação esquemática das fases da mitose. Modificado de <http://www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/images/8mitosiscropped.jpg>

Para que as células filhas sejam cópias exatas da célula inicial, as transições entre as diferentes fases do ciclo celular devem ser altamente reguladas. Isso se dá por um sistema de controle que consiste em uma série de eventos bioquímicos interconectados. Os componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular são as cinases dependentes de ciclinas. A atividade dessas enzimas varia durante as diferentes fases do ciclo graças à ação das proteínas reguladoras ciclinas, cuja síntese e degradação estabelecem o caráter cíclico do ciclo celular. Esse sistema inclui, também, três pontos principais de verificação: o primeiro ao final da fase G_1 , o segundo entre as fases G_2 e M e o terceiro na transição entre a metáfase e a anáfase (Houtgraaf *et al*, 2006).

A progressão entre as fases G_2 e M só pode ocorrer após o término da replicação do DNA. E a célula só poderá progredir da metáfase para a anáfase quando os cromossomos estiverem aderidos ao fuso mitótico. Além disso, mesmo que esses requisitos sejam atendidos, a ocorrência de lesões no DNA bloqueará a progressão do ciclo celular (Lazzaro *et al*, 2009). Esse dano pode resultar de falhas na replicação ou de exposição a agentes químicos ou a radiação. Nesses casos, o bloqueio ocorre, freqüentemente, na transição entre as fases G_1 e S ou entre G_2 e M e permite a remoção das lesões (Kao *et al*, 2001). Quando não é possível reparar o DNA, o bloqueio permanente do ciclo é seguido da ativação de mecanismos de apoptose (Houtgraaf *et al*, 2006). Porém, células tumorais freqüentemente apresentam alterações nos mecanismos de detecção de lesões e de reparo do DNA (Concin *et al*, 2000; Nadin *et al*, 2003), sendo capazes de ignorar a existência de aberrações cromossômicas.

A capacidade das células tumorais de se manterem viáveis apesar da presença de danos no DNA também pode estar relacionada a alterações nas vias de apoptose (Wendt *et al*, 2006). A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma organizada e controlada, de forma a minimizar a ativação do sistema imune. Esse processo de morte celular programada tem papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção dos organismos. A apoptose também está envolvida na formação de tecidos, no desenvolvimento do sistema imune e na manutenção da homeostase uma vez que permite a eliminação de células e tecidos lesados (Kerr *et al*, 1972). As células que entram em apoptose, inicialmente, sofrem retração e a membrana celular envolve partes do citoplasma formando vesículas chamadas corpos apoptóticos. Ao final, os fragmentos das células são removidos por fagócitos sem haver perturbação das células adjacentes (Wyllie *et al*, 1980; Savill, Fadok, 2000).

Durante a apoptose observa-se, também, condensação e fragmentação do núcleo (Robertson *et al*, 1978; Wyllie *et al*, 1980). Organelas como o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático e as mitocôndrias são fragmentadas (Frank *et al*, 2001; Lane *et al*, 2002). A fragmentação atinge não apenas estruturas, mas moléculas como o DNA e proteínas. Sabe-se que a clivagem de proteínas durante a apoptose é realizada, principalmente, por caspases (Nicholson, 1999; Creagh *et al*, 2003).

As caspases são sintetizadas como zimogênios praticamente inativos (Stennicke *et al*, 1998; Stennicke, Salvesen, 1998) e sua ativação resulta, em geral, de estímulos apoptóticos. Tais estímulos podem ser o passo inicial de uma das três vias de apoptose conhecidas (Figura 6). Na via extrínseca, alguns ligantes como Fas ou $TNF\alpha$ interagem com receptores de morte na membrana celular e recrutam proteínas adaptadoras como a FADD. Por sua vez, as proteínas adaptadoras recrutam e agregam moléculas de caspase 8 promovendo auto-processamento e ativação dessa caspase iniciadora. A caspase 8 ativa promove proteólise e ativação das caspases efetoras 3 e 7, o que resulta na degradação de inúmeros substratos e, finalmente, em morte celular (Taylor *et al*, 2008; Walsh *et al*, 2008).

Em algumas situações, a via extrínseca pode estabelecer comunicação com a via intrínseca por meio da proteólise de BID mediada por caspase 8. BID promove, então, a liberação de citocromo c e a formação do apoptossomo. Esse agregado protéico tem, além do citocromo c, moléculas de caspase 9 e Apaf1. BID é parte de uma família de proteínas que funcionam como sensores de estresse celular. Quando as proteínas que compõem essa família são ativadas acima de certo limiar, superam a ação inibidora dos membros de outra família, BCL-2, e promovem a formação de oligômeros de BAK-BAX na membrana mitocondrial (Taylor *et al*, 2008). Através dessas estruturas ocorre o efluxo de componentes do espaço intramembranar da mitocôndria para o citoplasma, entre eles o citocromo c. Com a subsequente ativação de caspase 9, desenvolve-se uma cascata proteolítica e a ativação de caspases efetoras (Slee *et al*, 1999).

Essas caspases também podem ser ativadas por uma via dependente de granzima B, uma protease presente em grânulos de linfócitos T citotóxicos e células NK (Anthony *et al*, 2010). Além de granzima B, os grânulos contêm uma proteína formadora de poros, a perforina, que se polimeriza na membrana das células alvo formando poros e permitindo a entrada da granzima (Masson, Tschopp, 1985; Podack *et al*, 1985). Após entrar na célula, a granzima B cliva seus substratos, entre eles BID, caspase 3 e 7, dando início à apoptose (Adrain *et al*, 2005).

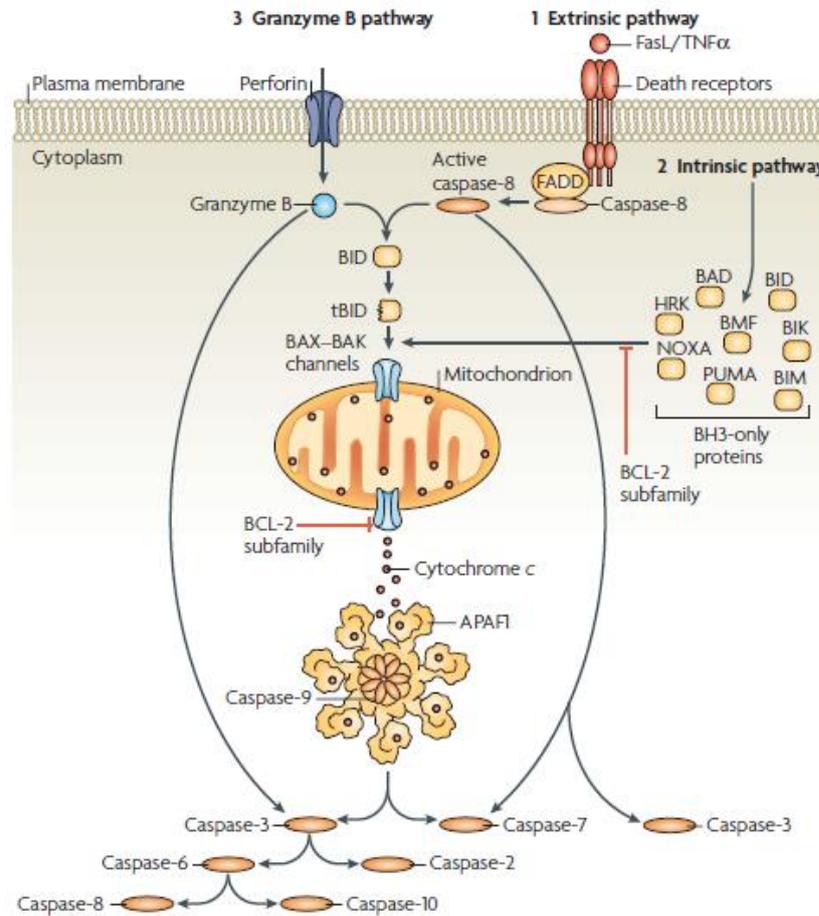


Figura 6 – Representação esquemática das vias de ativação de caspases durante a apoptose (Fonte: Taylor *et al*, 2008).

Entretanto, a redução da morte celular programada ocorre em diversos tipos de câncer e, geralmente, a expressão de indutores de apoptose está reduzida. Além disso, cada tumor apresenta um padrão diferente de expressão de proteínas associadas a esse tipo de morte celular. Sendo assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na redução da apoptose é importante para o desenvolvimento de estratégias eficazes de combate a cada tipo de neoplasia (Di Pietro *et al*, 2009). Atualmente, grande parte das pesquisas sobre câncer tem tido como objetivo desenvolver estratégias para superar a resistência das células tumorais aos tratamentos em uso clínico e induzir apoptose nas células tumorais. Porém, existem outras vias de morte celular que podem estar intactas nessas células e ser ativadas com o objetivo de superar a resistência à indução de morte por apoptose. Entre esses mecanismos, podem ser citadas a senescência, a autofagia, a catástrofe mitótica e a necrose (Okada, Mak, 2004).

A senescência celular foi descrita em 1961 por Hayflick e Moorhead. Nesse processo, a divisão celular é bloqueada de forma irreversível, mas as células permanecem metabolicamente ativas. Do ponto de vista bioquímico, a célula em senescência apresenta alterações metabólicas típicas, como a indução de β -galactosidase (Dimri *et al*, 1995). A senescência pode ser iniciada pelo encurtamento dos telômeros, uma propriedade bastante conhecida de células de mamíferos, ou por algum tipo de estresse (Singh *et al*, 2010). No caso de células tumorais, a senescência pode ser considerada um tipo de morte cuja importância pode ser comparada àquela da apoptose (Narita, Lowe, 2005).

Apesar de não haver eliminação da célula tumoral em decorrência da senescência, o controle da neoplasia pode ser alcançado uma vez que não há proliferação (Ohtani *et al*, 2009). Por essa razão, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver estratégias terapêuticas que induzam senescência em células de câncer. Um estudo recente demonstrou que a inibição farmacológica do complexo Skp2-SCF, que tem atividade oncogênica, induz senescência em células de câncer de próstata e reduz o crescimento de tumores *in vivo* (Lin *et al*, 2010), corroborando com o potencial uso desse tipo de abordagem terapêutica no câncer.

Outro mecanismo envolvido na destruição celular, a autofagia, pode ser descrito como uma espécie de auto-canibalismo no qual os lisossomos degradam estruturas celulares como organelas e membranas. A autofagia é um processo envolvido na manutenção da função celular ao destruir estruturas desgastadas ou mal-formadas (Gu *et al*, 2004; Iwata *et al*, 2006; Levine, 2007). Porém, também pode ser desencadeada por inúmeros tipos de estresse metabólico ou terapêutico como o bloqueio de vias de sinalização de fatores de crescimento (Lum *et al*, 2005), a ativação de vias de sinalização de MAPK (Corcelle *et al*, 2006), o acúmulo de cálcio intracelular (Hoyer-Hansen *et al*, 2007) e de espécies reativas de oxigênio (Scherz-Shouval *et al*, 2007). Enquanto alguns estudos demonstram efeitos protetores contra o desenvolvimento de tumores (Koneri *et al*, 2007; Miracco *et al*, 2007), outros apontam que a autofagia pode funcionar como mecanismo de resistência a terapias contra o câncer (Ding *et al*, 2008; Dalby *et al*, 2010).

Também tem sido amplamente investigado um tipo de morte celular denominado catástrofe mitótica. Esse processo resulta da tentativa de divisão de células com DNA danificado (De Bruin, Medema, 2008). Sabe-se que a presença de danos no DNA promove bloqueio do ciclo celular. Quando esse bloqueio não é eficiente e células com DNA danificado entram em mitose, ocorre morte por catástrofe mitótica (Roninson *et al*, 2001). Do ponto de vista morfológico, as células apresentam alterações características durante a catástrofe mitótica. É comum observar-se a presença de células gigantes, multinucleadas e com cromossomos descondensados (Singh *et al*, 2010). Além disso, pode ocorrer divisão em mais de duas células filhas com distribuição desigual de citoplasma, DNA e cromossomos (Castedo *et al*, 2004b).

A catástrofe mitótica pode ocorrer após exposição a fármacos que induzem hiperpolimerização de microtúbulos, como os taxanos, ou que causam despolimerização, como os alcalóides vincristina e vimblastina (Castedo *et al*, 2004a). Além disso, a catástrofe mitótica representa um dos principais mecanismos de morte celular associado à radioterapia (Chang *et al*, 1999). Os mecanismos moleculares responsáveis pela morte das células por catástrofe mitótica não foram completamente esclarecidos. Entretanto, sabe-se que diferentes tipos celulares entram em apoptose em consequência da catástrofe mitótica (Roninson *et al*, 2001). Além disso, a catástrofe mitótica pode resultar em morte celular por necrose (Mansilla *et al*, 2006; Vakifahmetoglu *et al*, 2008).

A necrose é, geralmente, considerada um tipo de morte celular não programada. Nesse processo, há aumento do volume celular, hidrólise do DNA e perda da integridade de membranas, inclusive de lisossomos. Com a lise da célula, o conteúdo intracelular é liberado e induz resposta inflamatória e imune no tecido adjacente (Kumar *et al*, 2005, p.3). Apesar de ser normalmente tida como um processo desordenado, estudos demonstram que a necrose é controlada pela interação de diferentes vias de sinalização (Festjens *et al*, 2006; Golstein, Kroemer, 2007). A proteína que interage com receptor de morte (RIP), bem como o fator 2 associado ao receptor de TNF, são importantes reguladores da necrose celular induzida por receptores de morte (Holler *et al*, 2000; Lin *et al*, 2004). Quando RIP é

ativada, é translocada para a mitocôndria e promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e depleção de ATP (Temkin *et al*, 2006).

Outra via que reduz a produção de ATP em células com DNA danificado envolve a ativação da poli-ADP-ribose polimerase a qual depleta o cofator da glicólise NAD^+ (Zong *et al*, 2004). O subsequente aumento do conteúdo intracelular de cálcio e de espécies reativas de oxigênio promove a ativação de calpaínas, proteases citoplasmáticas, e de fosfolipase A2. A proteólise e a peroxidação das membranas que resultam da atividade dessas enzimas levam à permeabilização da célula e à morte por necrose (Amaravadi, Thompson, 2007).

Apesar de se sobrepor à apoptose em células submetidas ao tratamento com RI e quimioterápicos, a necrose possui sistemas regulatórios e conseqüências diferentes da morte programada. Por exemplo, a resposta do sistema imune à necrose é bastante diferente daquela que ocorre em conseqüência da apoptose (Gallucci *et al*, 1999; Shi *et al*, 2000). Durante a necrose há liberação das chamadas alarminas, moléculas endógenas normalmente ausentes no meio extracelular (Oppenheim, Yang, 2005; Chen *et al*, 2007). As alarminas podem ser moléculas de RNA, DNA genômico, proteínas de choque térmico ou ácido úrico e recrutam macrófagos, células NK e dendríticas iniciando um processo inflamatório no sítio da necrose (Scaffidi *et al*, 2002; Shi *et al*, 2003). As células dendríticas, por sua vez, estimulam linfócitos T e a resposta imune adquirida (Matzinger, 2002; Trinchieri, Sher, 2007). A estimulação da resposta imune pode favorecer o controle do tumor. Entretanto, estudos com fármacos que interferem com estimuladores das vias de necrose ainda não estão disponíveis, em parte devido à falta de marcadores moleculares de necrose de utilidade comprovada (Amaravadi, Thompson, 2007).

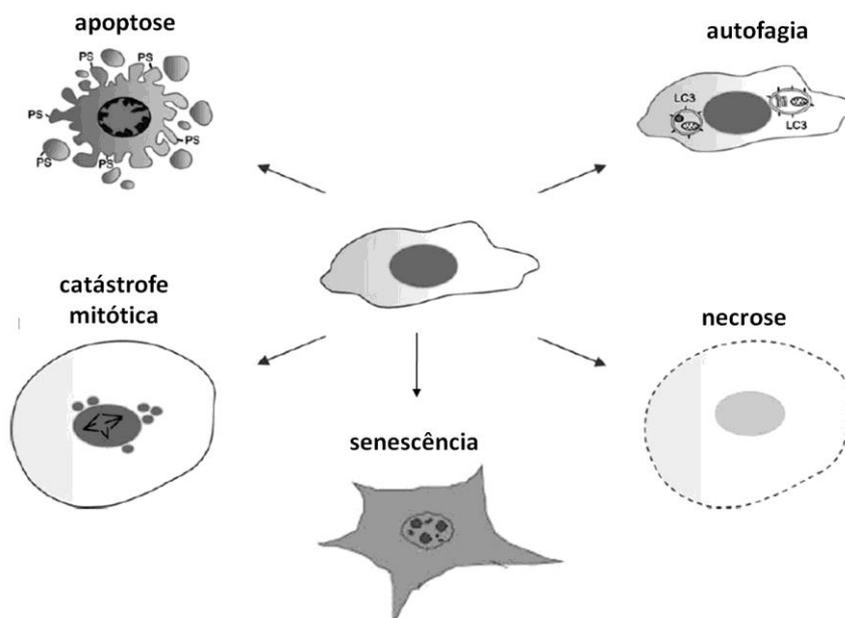


Figura 7 – Representação esquemática das alterações morfológicas características dos diferentes tipos de morte celular. Apoptose: formação de corpos apoptóticos, exposição de fosfatidilserina e condensação da cromatina. Autofagia: presença de vesículas autofágicas formadas pela fusão de lisossomos e estruturas celulares. Catástrofe mitótica: formação de micronúcleos, aumento do volume celular e presença de fusão mitótica anômala. Senescência: aumento da granulosidade do citoplasma, células apresentam-se esticadas e achatadas. Necrose: aumento do volume celular e perda da integridade da membrana plasmática. Modificado de De Bruin e Medema (2008) e Gewirtz *et al.* (2008).

Os estudos que investigam os mecanismos de morte celular, bem como aspectos variados sobre a biologia das células tumorais, são bastante relevantes. A partir deles são obtidas informações úteis para o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, permitem o estudo de estratégias que visam superar a resistência de células de câncer aos tratamentos atualmente disponíveis. Esses estudos se beneficiam da identificação de novos alvos moleculares, em sua maioria proteínas cuja expressão apresenta-se alterada em células tumorais em relação a células de tecidos saudáveis.

A identificação de novos alvos terapêuticos tem sido facilitada pelos avanços em estudos de genoma, transcriptoma e proteoma (Figura 8). O seqüenciamento do genoma humano criou grande expectativa sobre a descoberta da cura de pacientes com câncer. Entretanto, sabe-se que, graças ao processamento pós-transcricional

do mRNA e pós-traducional das proteínas, um gene pode dar origem a inúmeras proteínas. Portanto, a partir da análise gênica isolada não se obtém um panorama completo das proteínas presentes em uma célula. Por sua vez, a análise proteômica fornece informações mais precisas a respeito da interação entre o genoma celular e o ambiente (Banks *et al*, 2000). Dessa maneira, por estabelecer uma ligação entre a seqüência gênica e a fisiologia celular, a análise proteômica complementa a análise do genoma em pesquisas sobre novos marcadores para diagnóstico, prognóstico e avaliação da resposta ao tratamento (Clarke *et al*, 2008; Gast *et al*, 2009).

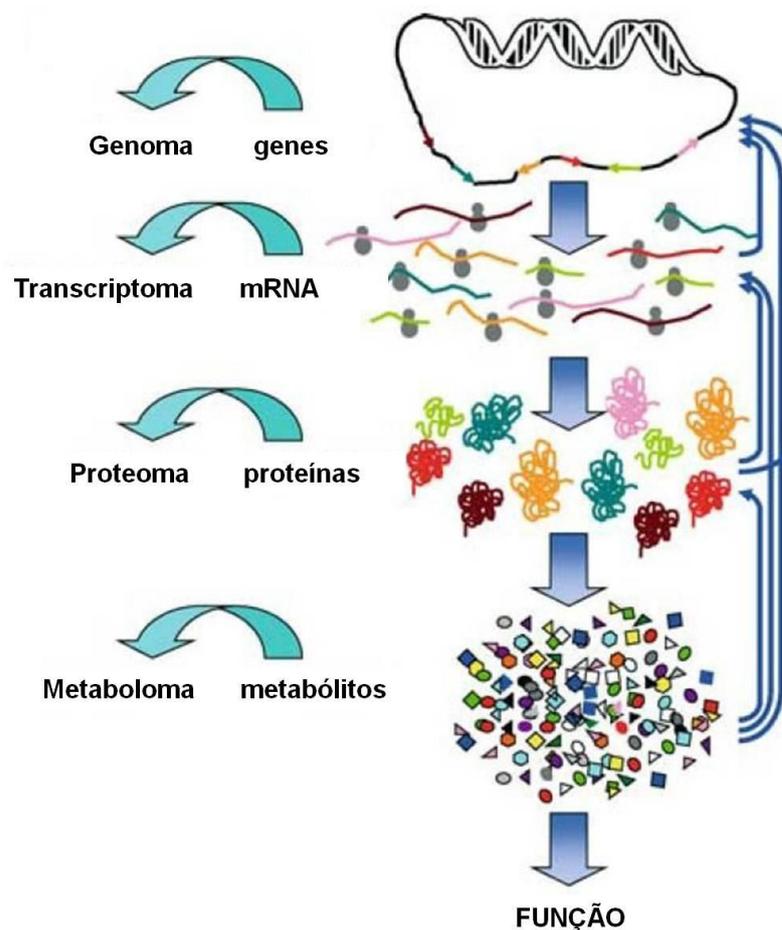


Figura 8 – Representação esquemática do fluxo de informação dos genes para a função (fenótipo). Modificado de Goodacre (2005).

Apesar dos inúmeros estudos que abordam o câncer de mama, as ferramentas usadas atualmente para o diagnóstico e definição de prognóstico desse câncer, em

muitos casos, não determinam o sucesso do tratamento (Ries *et al.*, 2007; Jemal *et al.*, 2008). Por essa razão, são necessários estudos para estabelecer marcadores adequados para esse tipo de neoplasia (Gast *et al.*, 2009).

O estudo proteômico do câncer de mama tem, portanto, como principais objetivos a identificação de marcadores que possam ser úteis no diagnóstico, na avaliação de prognóstico, na definição de tratamento e no monitoramento das pacientes durante e após a terapia. Também busca identificar moléculas relacionadas ao desenvolvimento do câncer ou à resistência de células tumorais a diferentes abordagens terapêuticas (Espinosa *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2008). Estudos proteômicos permitiram a identificação de proteínas superexpressas em células de câncer com aumento na expressão de HER-2, um receptor associado ao mau prognóstico no câncer de mama. Entre essas proteínas podem ser citadas a HSP 27, a triosefosfato isomerase, envolvida no metabolismo intermediário, além de proteínas com atividades antioxidante e detoxificante (Zhang *et al.*, 2005). Esse tipo de análise também demonstrou que a expressão reduzida da isoforma σ da proteína 14-3-3, envolvida no controle do ciclo celular, na diferenciação e na apoptose, não apresenta relação com o desenvolvimento do câncer de mama (Moreira *et al.*, 2005), como assumido anteriormente.

A análise proteômica tem sido aplicada tanto a linhagens celulares de câncer de mama (Hathout *et al.*, 2004; Pucci-Minafra *et al.*, 2006; Crugliano *et al.*, 2007) quanto a amostras coletadas de pacientes durante o tratamento (Celis *et al.*, 2005; Pucci-Minafra *et al.*, 2008) e tem se mostrado útil por fornecer grande volume de informações a respeito da expressão protéica nessas amostras. Muitos desses estudos são realizados com culturas de células as quais são ferramentas importantes e, relativamente, de fácil aplicação (Lacroix, Leclercq, 2004). No presente estudo foram usadas duas linhagens de câncer de mama humano, MACL-1 e MGSO-3, estabelecidas por Correa e colaboradores (2009) a partir de fragmentos de tumores primários de mama. As células dessas linhagens apresentam morfologia epitelial, são capazes de crescer em meio semi-sólido e são tumorigênicas em camundongos imuno-suprimidos. Ambas expressam telomerase e apresentam

expressão de MUC-1 superior àquela da linhagem comercial MDA-MB-231 (Correa *et al*, 2009).

O uso de diferentes linhagens em estudos de câncer de mama é importante uma vez que existe grande variedade genotípica e fenotípica nesse tipo de neoplasia (Vargo-Gogola, Rosen, 2007). Além disso, devido às suas características, as linhagens MACL-1 e MGSO-3 demonstram potencial para serem usadas como modelos no estudo de aspectos moleculares e celulares do câncer de mama. Entretanto, não há conhecimento a respeito da resposta das células dessas linhagens à radiação ionizante. Portanto, a investigação dessas respostas bem como dos mecanismos envolvidos seria relevante para a determinação da possível utilidade dessas células em pesquisas inovadoras no campo do desenvolvimento de fármacos, terapia hormonal e radioterapia.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito induzido pela radiação ionizante sobre as linhagens de câncer de mama humano MACL-1 e MGSO-3 e o perfil de expressão protéica dessas células.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a morte celular induzida pela radiação γ .
2. Avaliar os mecanismos envolvidos na resposta celular induzida pela radiação γ .
3. Avaliar o envolvimento de caspases na resposta celular induzida pela radiação γ .
4. Avaliar ocorrência de alteração na expressão protéica induzida pela radiação γ .
5. Comparar o perfil de expressão protéica de culturas de células de câncer de mama e de células saudáveis por eletroforese bidimensional.

2.3 Justificativa

Uma parte considerável do conhecimento a respeito do câncer de mama baseia-se em estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com culturas de células desse tipo de câncer. Entretanto, mais de dois terços dos estudos que usam células de câncer de mama foram realizados com três linhagens derivadas de metástases: MCF-7, MDA-MB-231 and T-47D. Para superar essa limitação, as culturas estabelecidas a partir de fragmentos de tumores primários de pacientes com câncer de mama são ferramentas importantes. Isso porque as células metastáticas apresentam inúmeras alterações em relação àquelas presentes no tumor primário.

Recentemente, duas linhagens de câncer de mama humano foram estabelecidas e caracterizadas em nosso laboratório: MACL-1 e MGSO-3. Em função de não haver conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos na morte induzida pela radiação ionizante nessas linhagens, a condução de um estudo que investigue de forma ampla esse aspecto é importante para estabelecer o potencial uso dessas linhagens celulares em estudos de biologia celular e molecular e de desenvolvimento racional de modelos para investigação de terapias do câncer de mama.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Foram usadas duas linhagens celulares estabelecidas por Correa e colaboradores (2009) a partir de amostras de tumores primários de pacientes com câncer de mama: MGSO-3 e MACL-1. Também foi usada uma linhagem comercial de células de câncer de mama da American Type Culture Collection (ATCC): MDA-MB-231 (Figura 9).

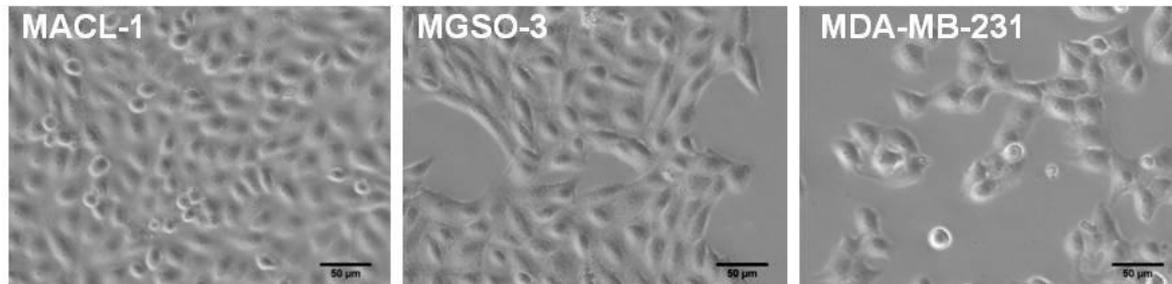


Figura 9 - Aspecto morfológico ao microscópio óptico das células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 (aumento de 300x).

3.2 Cultura celular

As células foram mantidas em frascos de cultura celular T-75 (TPP®) contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e com os antibióticos gentamicina (50 g/L), penicilina (500 U/mL) e estreptomicina (500 mg/mL) (GIBCO). As culturas foram

mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C. A manutenção das culturas foi realizada a cada dois ou três dias.

3.3 Tratamento das células com radiação γ

As células foram coletadas dos frascos de cultura por meio do uso de tripsina (GIBCO) que foi, posteriormente, inativada com DMEM + 10% SFB. A suspensão de células foi centrifugada e suspensa em 1 mL de meio de cultura. Após a contagem no hemocítmetro as células foram inoculadas em meio de cultura na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 24 poços ou 1×10^5 células/poço em placas de 6 poços e mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C por 24 horas.

O tratamento das células com radiação γ nas doses de 10 e 20 Grays (Gy) foi realizado com uma fonte de ⁶⁰Co, no Laboratório de Irradiação Gama do CDTN/CNEN. As células foram transportadas em placas ou garrafas de cultura vedadas e recolocadas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂ a 37 °C, imediatamente após o tratamento.

3.4 Avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)

O ensaio de metabolização de MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células (Mosmann, 1983). Esse ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, de converter o substrato MTT, solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, esse modelo pode ser usado com o objetivo de avaliar citotoxicidade e proliferação celular induzidas por diferentes estímulos.

As células cultivadas em placas de 24 poços foram submetidas ao tratamento com radiação γ (10 ou 20 Gy) e os ensaios de viabilidade foram realizados 24, 48 ou 72 horas após a irradiação. Nos tempos indicados o meio de cultura das placas foi removido e foram adicionados 170 μ L de solução de MTT (5mg/mL) e 210 μ L de DMEM + 10% SFB em cada poço. As amostras foram mantidas na estufa por duas horas para metabolização do MTT. Após esse período, foram adicionados 210 μ L de SDS/HCl 10%/poço e as placas foram incubadas por 18 horas para solubilização dos cristais de formazan. Foram coletados 100 μ L de cada poço e a leitura dos valores de absorbância da solução resultante foi realizada a 595 nm em um leitor automático de microplacas (Anthos 2010, Biochrom, UK). Os valores de densidade óptica dos grupos controle foram considerados como 100% para cálculo da porcentagem de alteração da viabilidade celular induzida pela irradiação.

3.5 Ensaio de clonogenicidade

O ensaio de clonogenicidade ou sobrevivência clonogênica permite a avaliação da capacidade das células formarem colônias em placas de cultura (Figura 10). Esse ensaio detecta as células que mantêm a capacidade de gerar um número considerável de células filhas após um tratamento que induz morte associada à divisão celular (Franken *et al*, 2006).

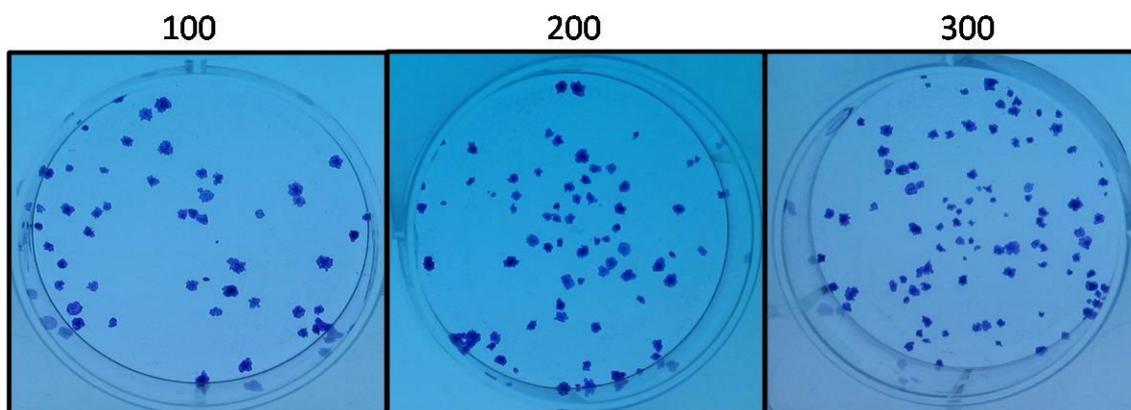


Figura 10 – Visualização das colônias formadas a partir do plaqueamento de células de câncer de mama não irradiadas nas densidades de 100, 200 e 300 células em placas de 6 poços. Imagens obtidas após 10 dias de incubação. As colônias foram fixadas com glutaraldeído e coradas com cristal violeta.

Nesse ensaio, as células foram inoculadas em meio de cultura na densidade de 2×10^5 células em frascos T-25 (TPP®), incubadas em estufa úmida contendo 5% de CO_2 à 37 °C por 24 horas e, posteriormente, irradiadas com 0, 10 ou 20 Gy. Imediatamente após o tratamento as células foram coletadas dos frascos de cultura por meio do uso de tripsina. Após a contagem no hemocitômetro as células foram inoculadas nas densidades de 100, 200, 300, 400 e 600 células/poço em placas de 6 poços e incubadas por 10 dias para avaliar o crescimento celular. Após esse período, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com tampão salina fosfato (PBS). As colônias foram, então, fixadas adicionando a cada poço 2 mL de solução contendo 6% (v/v) de glutaraldeído e 0,5% (p/v) de cristal violeta em água. As placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução fixadora foi removida, as placas foram lavadas cuidadosamente com água corrente e mantidas a temperatura ambiente até secagem completa. As colônias com mais de 50 células foram contadas com auxílio de microscópio invertido.

O número de colônias formadas a partir das culturas controle foi usado no cálculo de eficiência de plaqueamento (PE) de acordo com a equação abaixo:

$$PE = \frac{\text{número de colônias formadas}}{\text{número de células plaqueadas}} \times 100\%$$

O valor de PE e o número de colônias formadas a partir das culturas tratadas com 10 ou 20 Gy foram usados para o cálculo da fração de sobrevivência (FS) de acordo com a equação:

$$FS = \frac{\text{número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{número de células plaqueadas} \times PE}$$

3.6 Recuperação de células após a irradiação

Para a realização do ensaio de recuperação de células após a irradiação as células foram cultivadas em placas de 6 poços, tratadas com radiação γ (20 Gy) e mantidas em cultura até atingirem confluência. Essas células que não entraram em processo de morte celular foram transferidas para frascos de cultura T-25 e, posteriormente, para frascos T-75 (Tyrina *et al*, 2005). Após 21 dias as células recuperadas (R) e as células controle (não expostas previamente à RI) foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^4 células/poço) e irradiadas com 0, 10 ou 20 Gy. Posteriormente, a viabilidade dessas células foi avaliada por meio do ensaio de MTT, conforme descrito no item 3.4.

3.7 Determinação do conteúdo de DNA subdiploide por citometria de fluxo

A fragmentação do DNA induzida pela radiação γ foi avaliada por meio da análise, por citometria de fluxo, de núcleos corados com iodeto de propídeo (PI), um agente intercalante fluorescente que se liga ao DNA corando-o de vermelho. Essa substância é amplamente usada no estudo de morte celular, pois não penetra através da membrana celular íntegra e, portanto, diferencia células normais de células apoptóticas e necróticas (Aubry *et al*, 1999). O PI permite, também, analisar a distribuição de uma população de células entre as diferentes fases do ciclo celular. Isso porque a interação entre o corante e o DNA segue uma relação estequiométrica (uma molécula de PI a cada 4 a 5 pares de bases) e o conteúdo de DNA varia durante as diferentes fases do ciclo celular ($G_1 - 2n$; $G_2 - 4n$). Além disso, a fragmentação do DNA pode ser observada por meio dessa coloração, pois, quando ocorre, o conteúdo de DNA torna-se menor que $2n$ (subdiploide) (Nicoletti *et al*, 1991).

As células cultivadas em placas de 24 poços foram submetidas ao tratamento com radiação γ (10 ou 20 Gy) e os ensaios foram realizados 24, 48 ou 72 horas após a irradiação. Nos tempos indicados, as placas foram centrifugadas a 330 g por cinco minutos e o meio de cultura foi cuidadosamente removido. Foram adicionados 300 μ L de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS) contendo 50 μ g/mL de PI (Calbiochem-Novabiochem Corporation, USA) e 0,5% de Triton X-100 (Sigma, USA) em citrato de sódio 0,1% (Merck, Brasil). As placas foram incubadas por 4 horas a 4 $^{\circ}$ C e as amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson). A delimitação da população celular foi feita em gráficos de pontos de tamanho versus granulosidade. Para determinação do conteúdo de DNA subdiploide, a distribuição dos núcleos foi analisada no programa CellQuest (Becton Dickinson) em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência, como exemplificado na figura 11.

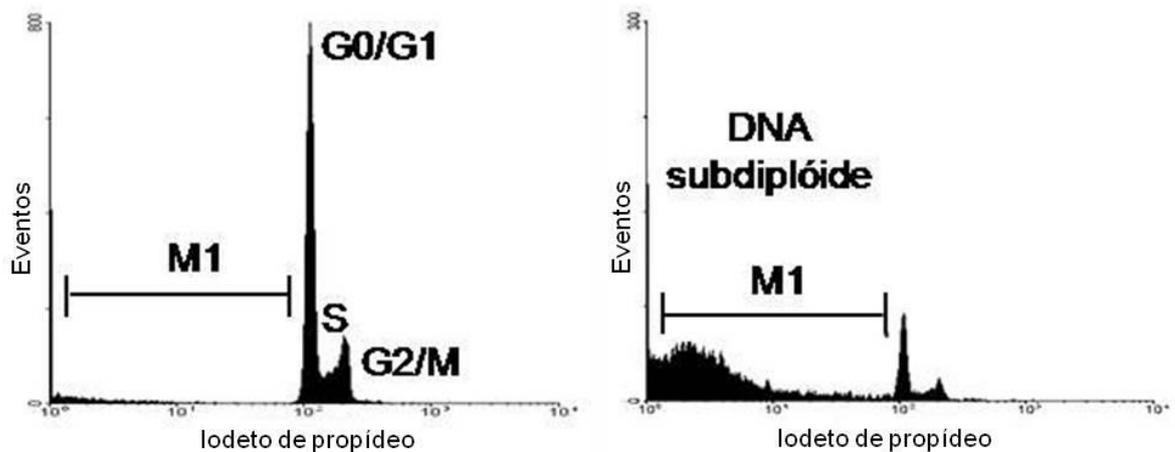


Figura 11 - Histograma representativo da análise do conteúdo de DNA subdiploide, representado no gráfico pelo marcador M1.

3.8 Determinação do índice mitótico

A histona 3 é uma proteína que se liga ao DNA e auxilia no enovelamento desse ácido nucléico. Essa histona é fosforilada apenas durante a mitose, o que permite seu uso para identificar células nessa fase do ciclo celular (Rodrigues *et al*, 2007). Nesse ensaio, as células foram semeadas na densidade de 2×10^5 células em lamínulas de vidro, mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C por 24 horas e submetidas ao tratamento com radiação γ (20 Gy). O ensaio de imunofluorescência foi realizado 24 horas após a irradiação.

Nesse momento o meio de cultura contido em cada poço foi delicadamente aspirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% (p/v) em PBS por 15 minutos, a temperatura ambiente. Depois de lavadas três vezes (5 minutos cada) com PBS as células foram permeabilizadas com PBS + Triton-X 100 0,1% (v/v) por 10 minutos a temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS. As lamínulas foram, então, incubadas com solução de bloqueio contendo 1% (p/v) de albumina bovina (BSA) e 5% (v/v) de soro de cabra em PBS por uma hora, a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS as lamínulas foram incubadas com o anticorpo primário de coelho anti-

histona-3-fosforilada (Upstate, USA). O anticorpo foi diluído 1:200 em PBS contendo 1% (p/v) de BSA. As lamínulas foram retiradas dos poços e colocadas em uma superfície limpa e impermeável sobre 100 µl da solução contendo o anticorpo primário, deixando as células em contato com a solução por 18 horas em câmara úmida, a 4 °C. Foi preparado, também, um controle negativo que foi incubado na ausência do anticorpo primário.

Após a incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, as células foram colocadas em contato com 100 µl da solução de anticorpo secundário diluído 1:500 em PBS contendo 1% (p/v) de BSA por uma hora em câmara úmida, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Foi usado o anticorpo de cabra anti-coelho conjugado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). As lamínulas foram novamente lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem. A marcação nuclear foi realizada com PI diluído em PBS (0,5 µg/ml) e as células foram marcadas seguindo os mesmos procedimentos anteriores, por 5 minutos, ao abrigo da luz, em câmara úmida e a temperatura ambiente. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes por 20 minutos e as lâminas montadas com Hydromount (National Diagnostics, EUA). Ao final deste processamento, as lâminas foram analisadas por meio de microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) no Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, usando-se os programas Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 e Adobe Photoshop CS.

As imagens para contagem de células em mitose foram adquiridas aleatoriamente. Foram contadas pelo menos 200 células/lamínula e o experimento foi realizado em triplicata. O cálculo do índice mitótico foi realizado conforme a equação a baixo:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células em mitose}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

3.9 Ensaio de dupla coloração com anexina V-FITC e PI

Esse ensaio baseia-se na afinidade da anexina V pelo fosfolípide de membrana fosfatidilserina. Esse fosfolípide encontra-se voltado para a face interna da membrana celular e é exposto na face externa durante os estágios iniciais da apoptose. Nessa fase as células mantêm a integridade da membrana celular, o que impede a penetração do PI. A permeabilização da membrana nos estágios mais avançados da apoptose permite a penetração desse corante e as células tornam-se duplo-marcadas. Portanto, esse ensaio permite a quantificação de células em estágios iniciais de apoptose bem como sua diferenciação daquelas em estágios tardios de apoptose ou em necrose (Aubry *et al*, 1999).

Para a realização desse ensaio, as células foram coletadas por meio do uso de tripsina 48 horas após o tratamento com 20 Gy. Após serem lavadas com PBS, as células foram suspensas em 100 µL de tampão de ligação (BD Pharmingen, USA) e incubadas com 10 µL de PI (50 µg/mL) e 5 µL de anexina V-FITC (BD Pharmingen, USA) por 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram imediatamente submetidas à análise por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson) utilizando o programa CellQuest (Becton Dickinson) para determinação da porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC, PI ou duplo-marcadas.

3.10 Tratamento com inibidor de caspases

Antes do tratamento das células com radiação γ o meio de cultura foi removido e foram acrescentados 300 µL de DMEM + 10% SFB contendo 80 µmol/L do inibidor de caspases Z-Val-Ala-Asp(OCH₃)-fluorometilcetona (zVAD-FMK - Biomol International LP, UK). As placas de cultura foram incubadas durante uma hora em estufa úmida de CO₂ (Souza-Fagundes *et al*, 2003). Após esse período foram acrescentados 700 µL de DMEM + 10% SFB em cada poço e as placas foram submetidas ao tratamento com radiação γ (20 Gy). O conteúdo de DNA subdiplóide

e a viabilidade celular foram determinados 48 horas após a irradiação, conforme descrito nos itens 3.7 e 3.4, respectivamente.

3.11 Ensaio de ativação de caspases 8 e 9

A ativação das caspases 8 e 9 foi detectada por meio do kit *ApoTarget* (Invitrogen, USA), sendo que o experimento foi realizado de acordo com a orientação do fabricante. As células foram coletadas por meio do uso de tripsina 24 ou 30 horas após o tratamento com 20 Gy. A lise foi realizada com Caspase Assay Kit Cell Lysis Buffer (Invitrogen, USA) e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford. Para o ensaio de atividade de caspase foram usados 200 µg de proteínas. Nesse ensaio, foram usados substratos conjugados a cromóforos específicos para caspases 8 e 9, IETD- ρ NA e LEHD- ρ NA, respectivamente. Após incubação por duas horas em estufa úmida, a 37 °C, a absorbância das amostras foi analisada a 405 nm em um leitor de placas (Anthos 2010, Biochrom, UK). O resultado foi expresso como unidades relativas de absorbância em comparação com os valores do grupo controle (não irradiado).

3.12 Detecção de caspase 3 ativa por citometria de fluxo

As células foram coletadas por meio do uso de tripsina 30 horas após o tratamento com 20 Gy. Após lavagem com PBS as células foram fixadas e permeabilizadas com o tampão Cytotfix/Cytoperm™ (BD Pharmingen, USA) por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a marcação com o anticorpo anti-caspase 3 ativa conjugado a FITC (BD Pharmingen, USA) em tampão Perm/Wash™ (BD Pharmingen, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson). A porcentagem de células com caspase 3 ativa foi determinada por meio do programa

CellQuest (Becton Dickinson) em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência.

3.13 Cultura de células de tecido de mama saudável

A cultura transitória de células de mama saudável foi obtida em nosso laboratório a partir de fragmentos de tecido de mamoplastia. O tecido foi gentilmente doado pelo Dr. Evaldo Lacerda Vilaça com o consentimento livre e esclarecido da paciente. O material foi processado imediatamente após a cirurgia. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente estéril. Inicialmente, o tecido foi lavado com DMEM e fragmentado com o auxílio de uma tesoura. Em seguida, foi imerso em solução contendo 2% de colagenase (Sigma-Aldrich, USA) em PBS e mantido em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado em gaze estéril para remoção dos fragmentos de tecido. O filtrado contendo células foi transferido para três frascos de cultura T-25 que foram incubados em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. As culturas foram observadas diariamente e o meio de cultura foi substituído a cada três dias. Quando atingiram confluência, as células foram transferidas para três frascos T-75. Após doze semanas as células foram coletadas conforme descrito no item 3.14.1.

3.14 Eletroforese bidimensional

3.14.1 Extração de proteínas

O meio de cultura das garrafas T-75 foi coletado em tubos de 50 mL estéreis. Em seguida, foram adicionados 5 mL de DMEM a cada garrafa e, com o auxílio de um raspador de células estéril, as células foram desprendidas. O conteúdo de cada garrafa foi transferido para os tubos correspondentes. As garrafas foram lavadas

duas vezes com 5 mL de DMEM, que também foi recolhido. Os tubos foram centrifugados a 330 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi lavado com 5 mL de DMEM. Após nova centrifugação, as células foram suspensas em 1 mL de DMEM. A suspensão foi transferida para tubos de 2 mL e centrifugada a 12800 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido a fim de que o precipitado de células estivesse livre de DMEM. Esse material foi submetido ao processo de lise conforme descrito a seguir.

Ao precipitado de células foi adicionado um volume de tampão de lise (uréia 7 M; tiouréia 2 M; CHAPS 4%) equivalente ao volume estimado do material inicial. As células foram suspensas com o auxílio de um vortex e mantidas em gelo, sob agitação, durante 2 horas. A fim de melhorar o processo de lise, o conteúdo de cada tubo foi passado dez vezes por uma agulha de 12 G com o auxílio de uma seringa. O material foi, então, centrifugado por 30 minutos a 12800 g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo, a concentração de proteínas foi determinada com o kit 2D Quant (Amersham Biosciences, UK) e as amostras foram armazenadas a -70 °C.

3.14.2 Marcação de proteínas para eletroforese bidimensional diferencial por fluorescência (2D-DIGE)

Após a determinação da concentração de proteínas, foi realizada a marcação com os corantes fluorescentes CyDye DIGE FluorsTM Cy2, Cy3 e Cy5 (GE Healthcare, UK). Uma vez que o pH ideal para a ligação dos corantes às proteínas é de 8,5; o pH das amostras foi ajustado com solução de hidróxido de sódio (0,1 M) ou ácido clorídrico (0,1 M). Em seguida, alíquotas contendo 160 µg de proteínas foram marcadas conforme as tabelas 1 e 2. O padrão interno foi preparado pela mistura de quantidades iguais de proteínas de cada amostra usada no experimento. O volume final do padrão interno foi dividido entre os géis após a marcação com Cy 2. Foi usada a proporção de 1,2 pmol de corante/µg de proteínas.

Tabela 1 – Coloração de amostras protéicas usadas nos géis 2D-DIGE para comparação da expressão protéica de células MDA-MB-231 controle e tratadas com 20 Gy.

Número do gel	Cy 2	Cy 3	Cy 5
1	Padrão interno	Controle 1	20 Gy 1
2	Padrão interno	20 Gy 2	Controle 2

Tabela 2 – Coloração de amostras protéicas usadas nos géis 2D-DIGE para comparação da expressão protéica de células saudáveis e das linhagens MACL-1 e MGSO-3.

Número do gel	Cy 2	Cy 3	Cy 5
1	Padrão interno	MACL-1	MGSO-3
2	Padrão interno	saudável	MACL-1
3	Padrão interno	MGSO-3	saudável

Após adicionar cada corante à amostra correspondente, os tubos foram homogeneizados, rapidamente centrifugados e mantidos em gelo por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, 1 μ L de solução de lisina 10 mM foi adicionado a cada tubo com o objetivo de interromper a reação de ligação dos corantes aos resíduos de lisina das proteínas presentes nas amostras. Após mistura por pipetagem e breve centrifugação, as amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos, ao abrigo da luz.

3.14.3 Focalização isoeletrica

Os extratos celulares foram submetidos à eletroforese bidimensional (2D), que separa proteínas de acordo com o ponto isoeletrico e o peso molecular. Para realização da focalização isoeletrica as amostras foram aplicadas em tiras de Immobiline Drystrip Gel (GE Healthcare, UK) por meio de reidratação passiva em bandeja de reidratação, durante 12 horas, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Foram usadas tiras de 13 cm com faixa de pH de 3 a 10 não-linear para

2D. Para as amostras analisadas por 2D-DIGE foram usadas tiras de 18 cm com faixa de pH de 3 a 10 não-linear.

Para a hidratação das tiras de Immobiline Drystrip Gel, as amostras marcadas com os corantes fluorescentes foram reunidas para preparo dos géis conforme as tabelas 1 e 2. As amostras usadas em géis não fluorescentes foram aplicadas em tiras individuais. Às amostras de proteínas foi acrescentado tampão de reidratação (uréia 7 M; tiouréia 2 M; CHAPS 2%; tampão IPG pH 3-10 2%; DTT 10 mg/ml; azul de bromofenol 0,002%) para volume final de 250 ou 340 µl para aplicação nas tiras de 13 e de 18 cm, respectivamente.

Foi usado o programa de focalização sugerido pelo fabricante conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Programa de focalização para tiras de Immobiline Drystrip Gel de 13 e 18 cm na unidade de focalização isoeletrica Ettan IPGphor II (GE Healthcare, UK). Condições de focalização: 20 °C, corrente de 50 µA/tira.

Modo de voltagem	Voltagem (V)		Tempo (h:min)		Volt-hora (kVh)	
	13 cm	18 cm	13 cm	18 cm	13 cm	18 cm
Step	500		1:00		-	
Gradiente	1000		-		800	
Gradiente	8000	10000	-		11300	16500
Step	8000	10000	-		5400	13700
Gradiente	500		1:00		-	

3.14.4 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a focalização isoeletrica, as tiras foram incubadas por 15 minutos, sob agitação a temperatura ambiente, em tampão de equilíbrio (uréia 6 M; Tris-HCl 75mM; glicerol 29,3%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,002%) contendo 10 mg/mL de DTT (Sigma-Aldrich, USA), seguidos de 15 minutos em tampão de equilíbrio contendo 25 mg/mL

de iodoacetamida (GE Healthcare, UK). Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, que separa proteínas de acordo com o peso molecular, no sistema Ettan Dalt Six (Amersham Biosciences, UK). Após o equilíbrio, as tiras foram posicionadas na parte superior dos géis de poliacrilamida e a eletroforese foi realizada com corrente de 50 mA/gel com resfriamento. Nos experimentos em que foram usadas amostras marcadas com corantes fluorescentes, todos os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz e foram usadas placas de vidro de baixa fluorescência para montagem dos géis de poliacrilamida.

3.14.5 Detecção de proteínas e análise dos géis bidimensionais

Imediatamente após o término da 2D-DIGE, os géis foram escaneados no equipamento Typhoon™ 9410 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, UK) e, em seguida, corados conforme procedimento descrito a seguir. A análise dos géis foi realizada com os programas Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, UK) e DeCyder 7.0 (GE Healthcare, UK). Para avaliar a diferença na expressão protéica foi aplicado o teste *t* de Student, considerando-se $p < 0,05$ como significativo.

Para coloração, os géis foram inicialmente fixados em solução contendo 2% de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 30% de etanol, durante 1,5 hora; sendo que a solução fixadora foi substituída a cada 30 minutos. Em seguida, os géis foram incubados por três intervalos de 10 minutos em uma segunda solução fixadora (H_3PO_4 2%). Por fim, os géis foram mantidos por 30 minutos em solução contendo 2% de H_3PO_4 , 18% de etanol e 12% de sulfato de amônio. Após esse período foi acrescentada solução de azul de comassie coloidal 2% para proporção final de 5 mL/L. Os géis foram mantidos na solução de coloração por 5 dias e digitalizados no Image Scanner (Amersham Biosciences, UK). Para conservação, os géis foram mantidos em etanol 20% (v/v) até o momento da coleta das proteínas de interesse.

3.14.6 Digestão trípica em gel bidimensional

As proteínas de interesse foram recortadas dos géis com o auxílio de um bisturi nº 15. Os fragmentos de gel foram lavados com 350 µL de água Milli-Q por 5 minutos. Após a remoção da água os fragmentos foram mantidos em 190 µL de acetonitrila por 20 minutos e secos em SpeedVac (Savant) por cerca de 15 minutos. Em seguida, foram acrescentados 15 µL de solução de tripsina (Promega, USA) a 20 ng/µL em bicarbonato de amônio 25 mM e os fragmentos de gel foram mantidos em gelo por 60 minutos. O excesso de tripsina foi removido e a digestão foi realizada em banho-maria a 58 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1 µL de solução de ácido fórmico a 5% (v/v).

A fim de extrair os peptídeos, foram acrescentados 30 µL de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos e mantidos em sonicador de banho por 10 minutos. A solução com peptídeos foi recolhida em tubos Eppendorf para PCR. O procedimento de extração foi repetido e a solução de peptídeos foi combinada aos extratos anteriores. Em seguida, as amostras foram concentradas até cerca de 10 µL em SpeedVac (Savant). Por fim, os peptídeos foram purificados e concentrados em ZipTip (resina C18; P10, Millipore Corporation, MA). A eluição foi feita em tubos Eppendorf para PCR em 4 µL de solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1%. Os peptídeos foram armazenados a -20 °C para posterior análise por espectrometria de massa.

3.14.7 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Cada amostra (1 µL) foi gotejada em uma placa de amostras (MTP AnchorChip 600/384) e misturada com o mesmo volume de uma solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico; Aldrich, WI) na concentração de 10 mg/ml em acetonitrila 50%/ácido trifluoroacético 0,3%. Os espectros MS e MS/MS foram obtidos usando

um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Alemanha), controlado pelo programa FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). Ambos os espectros foram obtidos em modo positivo/refletido, com a frequência do laser ajustada em 50 Hz. O aparelho foi calibrado com padrão externo *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics, Alemanha). Os dados foram analisados com o programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As proteínas foram identificadas a partir dos espectros de MS combinados com MS/MS usando os programas Biotools 3.0 e MASCOT para a taxonomia *Homo sapiens* no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, seguida pelo teste de Bonferroni, que realiza a comparação de todos os grupos entre si. Os géis bidimensionais foram analisados por meio do teste *t* de Student. Adotou-se o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade induzida pela radiação γ nas linhagens de células de câncer de mama

O ensaio de MTT foi usado a fim de avaliar o efeito induzido pela radiação γ sobre o metabolismo celular nas linhagens de câncer de mama usadas no presente estudo. A exposição das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 à RI não alterou significativamente o metabolismo celular 24 horas após o tratamento. Após 48 horas, observou-se redução estatisticamente significativa do metabolismo nas três linhagens celulares avaliadas. Por outro lado, 72 horas depois da exposição das células à RI, observou-se redução do metabolismo celular nas linhagens MACL-1 e MGSO-3, mas não na linhagem MDA-MB-231 (Figura 12). Apesar de estatisticamente significativa, a redução do metabolismo celular foi de pequena magnitude e transitória uma vez que houve recuperação das culturas após três semanas.

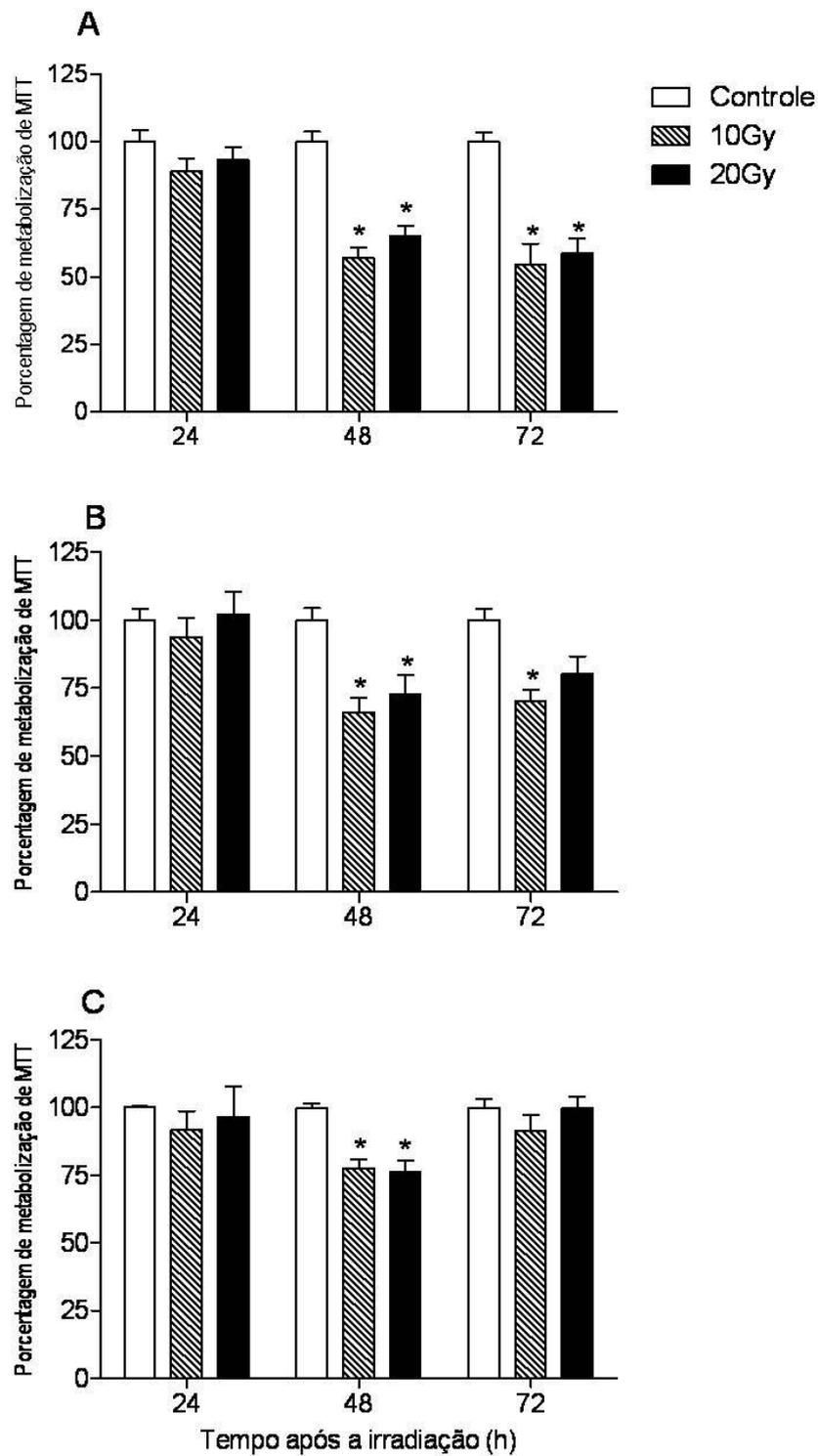


Figura 12 - Efeito induzido pela RI (10 ou 20 Gy) sobre a metabolização de MTT pelas células MACL-1 (A), MGSO-3 (B) e MDA-MB-231 (C). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Também foi avaliada a capacidade de formação de colônias após o tratamento com a RI. Após 10 dias de incubação, as colônias foram fixadas e contadas (Figura 13). A eficiência de plaqueamento foi de 39%, 38% e 41% para as linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231, respectivamente. O tratamento com 10 ou 20 Gy reduziu substancialmente a sobrevivência clonogênica das células dessas três linhagens (Figura 14).

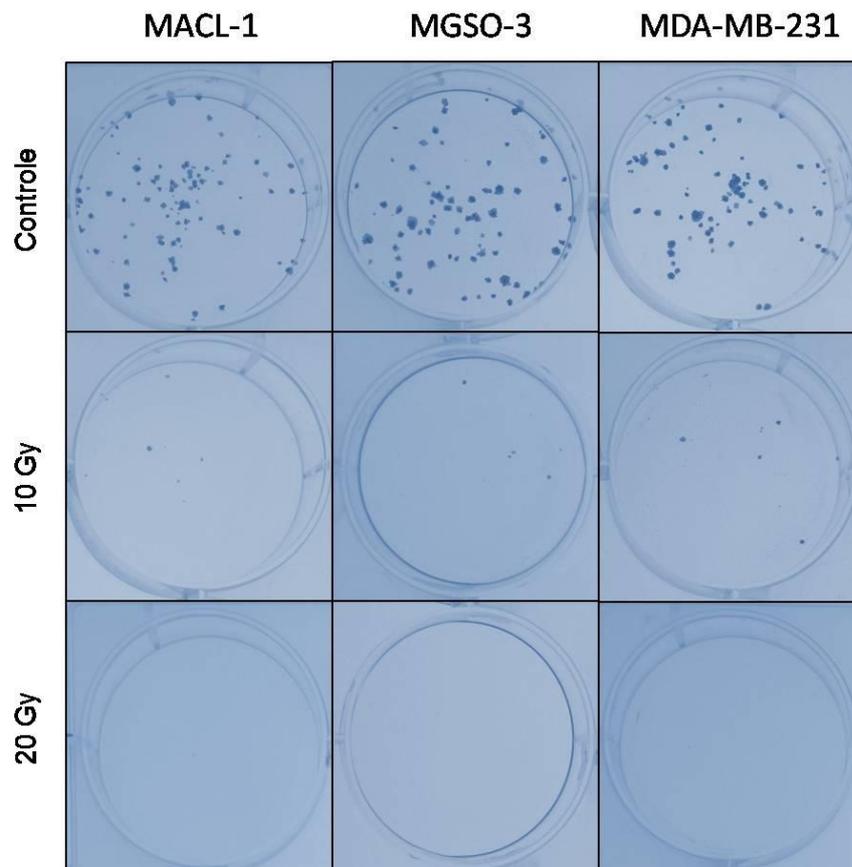


Figura 13 - Imagens representativas da formação de colônias das linhagens de câncer de mama MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 10 dias após o tratamento com RI (10 ou 20 Gy). O controle foi estabelecido por células que não receberam tratamento.

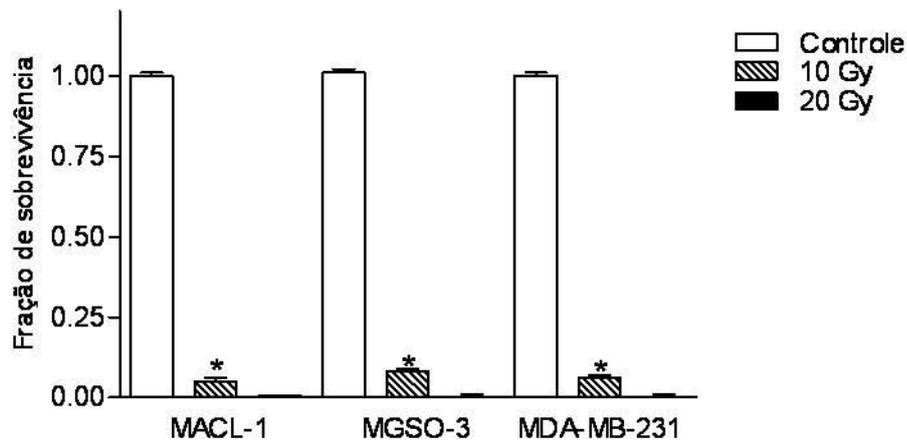


Figura 14 - Efeito induzido pela RI (10 ou 20 Gy) sobre a sobrevivência clonogênica das células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2 Recuperação das linhagens após tratamento com radiação γ

A recuperação das culturas celulares após o tratamento com RI pode indicar que as linhagens usadas apresentam certo grau de radiorresistência. A fim de avaliar se doses repetidas de radiação induziriam alterações na resposta celular em relação àquela induzida por exposição única à radiação γ , foi seguido o protocolo descrito por Tyrsina e colaboradores (2005). A resposta das células recuperadas (R) a um novo tratamento com RI não diferiu, de forma significativa, daquela das células irradiadas apenas uma vez (Figura 15).

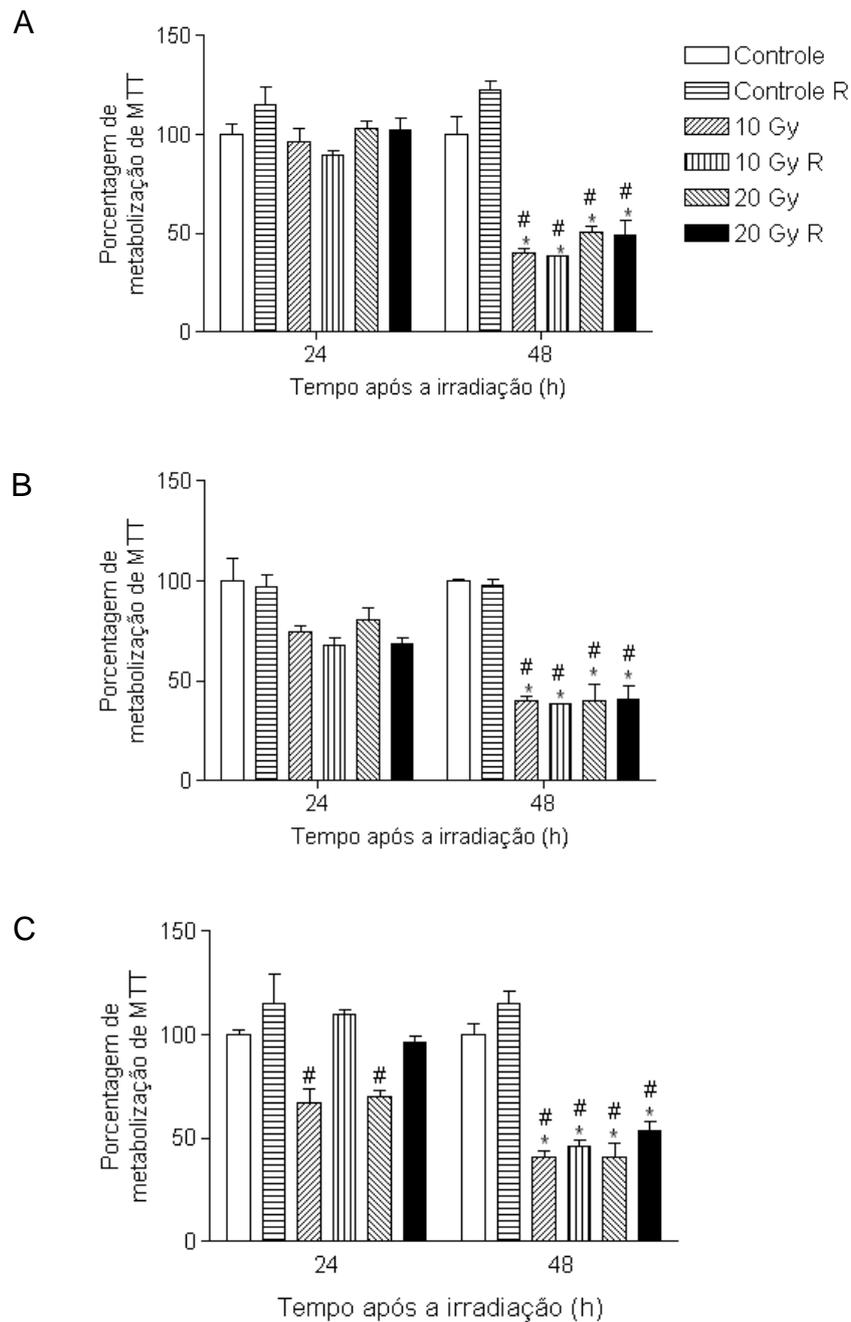


Figura 15 – Efeito induzido pela RI (10 ou 20 Gy) sobre a metabolização de MTT pelas células MACL-1 (A), MGSO-3 (B) e MDA-MB-231 (C) controle e recuperadas (R). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * e #: diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e controle recuperado ($p < 0,05$).

4.3 Bloqueio do ciclo celular induzido pela radiação γ

A fim de identificar células em mitose, foi usado um anticorpo anti-fosfo-histona-3 e as células foram analisadas por microscopia confocal. A coloração das células com PI permitiu, ainda, a visualização dos núcleos. Na figura 16, nos campos de luz transmitida e na imagem em que se observa a coloração dos núcleos por PI (vermelho), é possível observar a presença de 34 células. Dentre elas, quatro células foram marcadas pelo anticorpo anti-fosfo-histona-3 e seus núcleos apresentaram morfologia característica de prófase (setas brancas) e pró-metáfase (setas amarelas). Nas demais células não há indício de marcação pelo anticorpo anti-fosfo-histona-3.

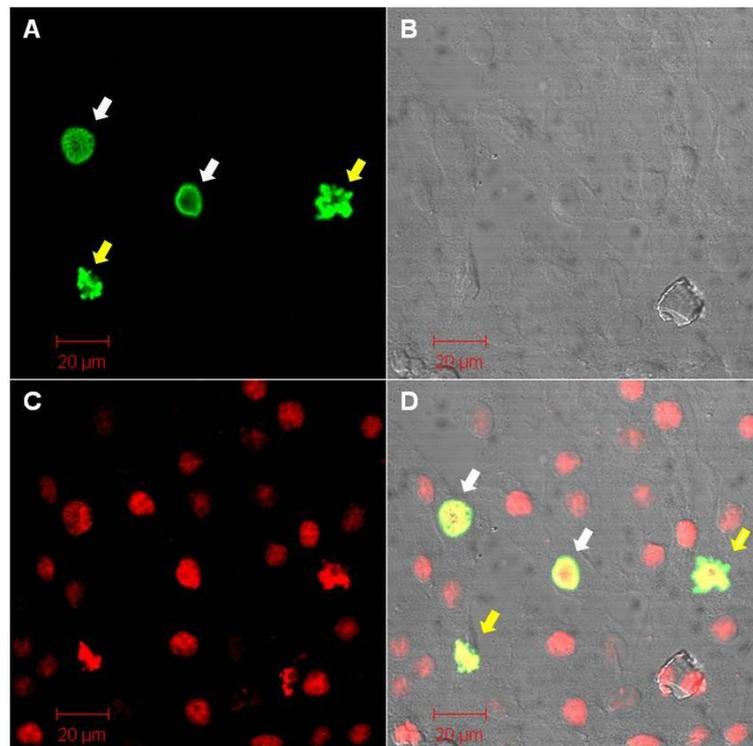


Figura 16 – Perfil de células da linhagem MACL-1 em mitose. Em verde está representada a marcação com histona-3-fosforilada e em vermelho a marcação de núcleos com PI. No painel superior à esquerda (A) está representada a marcação com anticorpo anti-histona-3-fosforilada e à direita (B) a imagem de luz transmitida (DIC). No painel inferior à esquerda (C) está representada a imagem da marcação dos núcleos com PI e à direita (D) a sobreposição das imagens.

Nas células não tratadas com RI foi possível observar a presença de diversas figuras mitóticas após marcação com anticorpo anti-fosfo-histona-3 (verde) e PI (vermelho). Na figura 17 foram incluídas imagens representativas de núcleos de células da linhagem MACL-1 em prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase. A contagem dessas figuras mitóticas foi usada no cálculo do índice mitótico que representa a porcentagem de células em mitose.

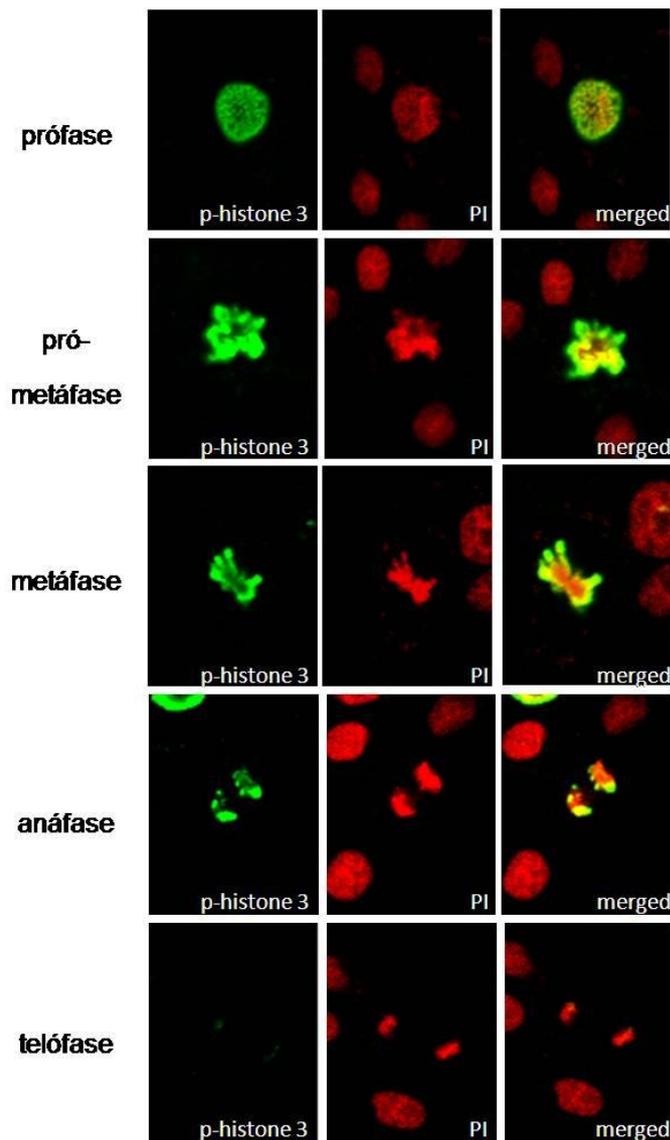


Figura 17 – Imagens representativas de células da linhagem MACL-1 em diferentes fases do ciclo celular. As imagens de imunofluorescência foram obtidas por microscopia confocal após marcação com anticorpo anti-fosfo-histona-3 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) para marcar o núcleo.

O tratamento com RI (10 ou 20 Gy) induziu bloqueio do ciclo celular após 24 horas nas três linhagens usadas. O bloqueio ocorreu na fase G2, como evidenciado pelo aumento do pico correspondente às células com conteúdo de DNA 4n (Figura 18) e pela ausência de alteração no índice mitótico das células tratadas em relação às células controle (Figura 19).

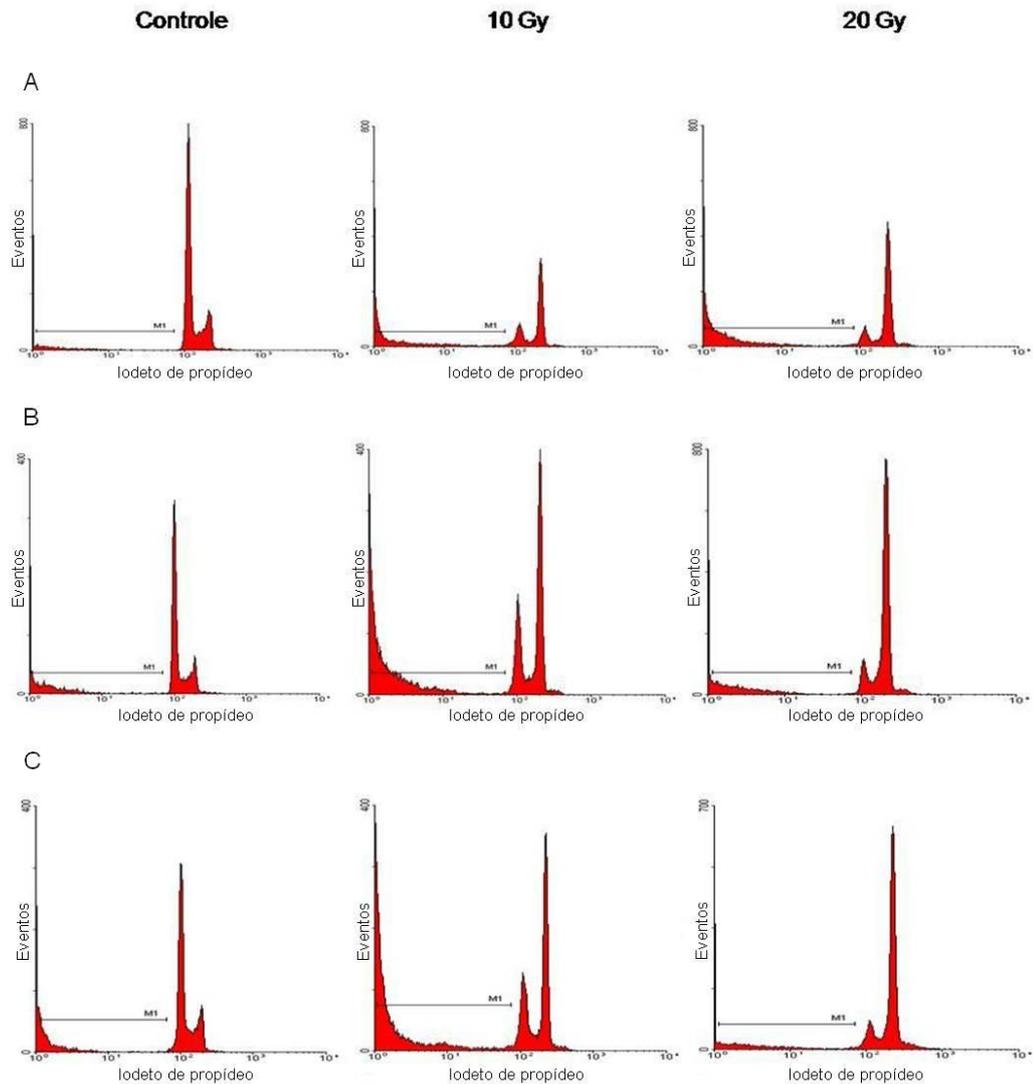


Figura 18 - Distribuição da população de células MACL-1 (A), MGSO-3 (B) e MDA-MB-231 (C) coradas com iodeto de propídeo 24 horas após tratamento com RI (10 ou 20 Gy). Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo.

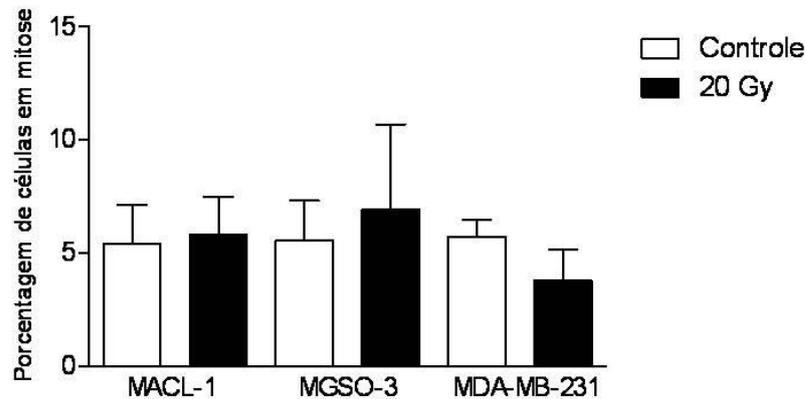


Figura 19 – Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a porcentagem de células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 em mitose 24 horas após o tratamento. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes (três réplicas para cada experimento).

Apesar de não ter sido observada alteração no índice mitótico 24 horas após o tratamento com 20 Gy, foi observada a presença de células com morfologia nuclear alterada e distribuição desigual de cromossomos durante a mitose em células tratadas com RI (Figura 20).

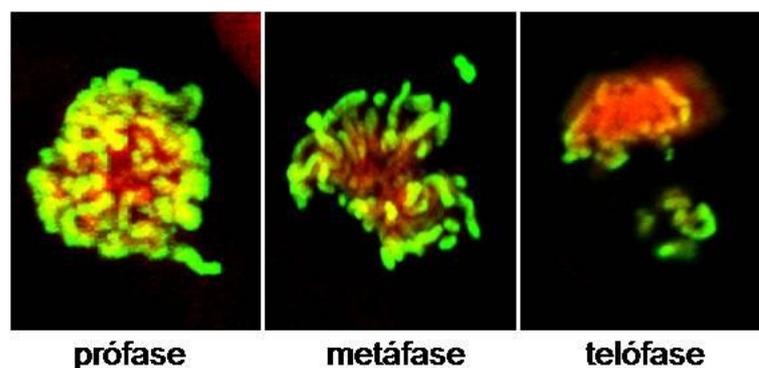


Figura 20 – Imagens representativas de células da linhagem MACL-1 em diferentes fases do ciclo celular 24 horas após o tratamento com RI (20 Gy). As imagens de imunofluorescência por microscopia confocal foram obtidas após marcação com anticorpo anti-fosfo-histona-3 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) para marcar o núcleo.

4.4 Fragmentação do DNA induzida pela radiação γ

Uma vez que foi observado que a radiação γ reduz a viabilidade celular, altera a morfologia nuclear e induz bloqueio do ciclo celular, foi avaliada a fragmentação do DNA induzida pela RI. As culturas de células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 foram coradas com PI e analisadas por citometria de fluxo. O aumento da população na região do marcador M1 foi avaliado 24, 48 e 72 horas após o tratamento com 10 ou 20 Gy nas três linhagens usadas (Figuras 18, 21, 22 e 23). A análise quantitativa da população de células com DNA fragmentado feita no programa Cell Quest demonstrou que não houve aumento de fragmentação do DNA 24 horas após o tratamento em nenhuma das linhagens avaliadas. Porém, foi observado aumento estatisticamente significativo do número de células com conteúdo de DNA subdiploide 48 e 72 horas após o tratamento com 10 ou 20 Gy (Figura 24). Esse aumento do conteúdo de DNA fragmentado pode ser interpretado como morte celular.

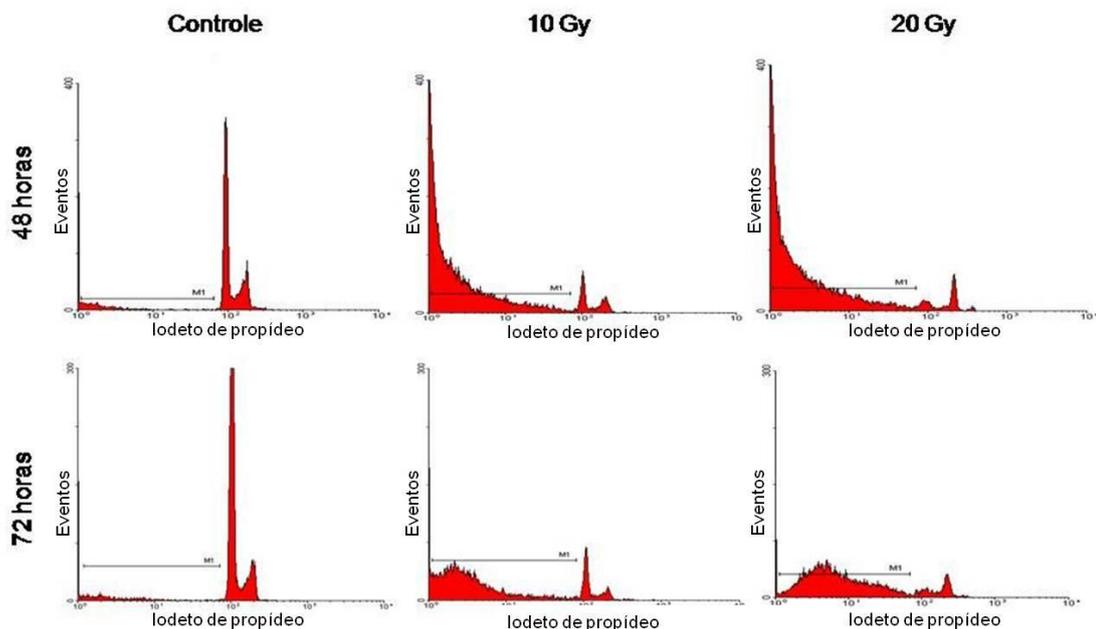


Figura 21 – Distribuição da população de células MACL-1 coradas com iodeto de propídeo após tratamento com RI (10 ou 20 Gy). Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo realizada 48 e 72 h após a irradiação.

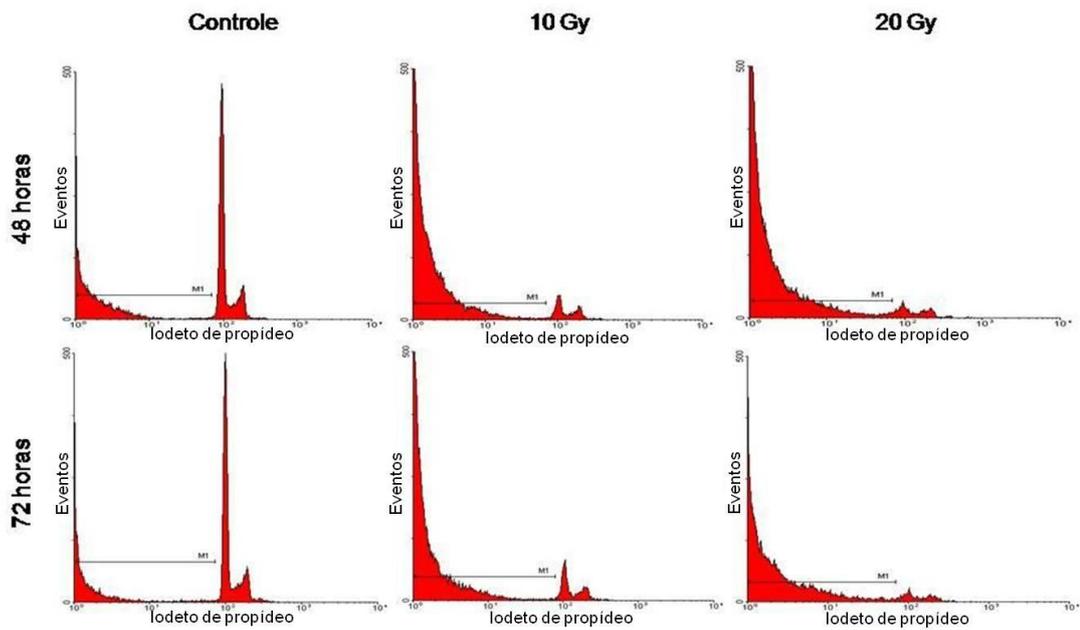


Figura 22 – Distribuição da população de células MGSO-3 coradas com iodeto de propídeo após tratamento com RI (10 ou 20 Gy). Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo realizada 48 e 72 h após a irradiação.

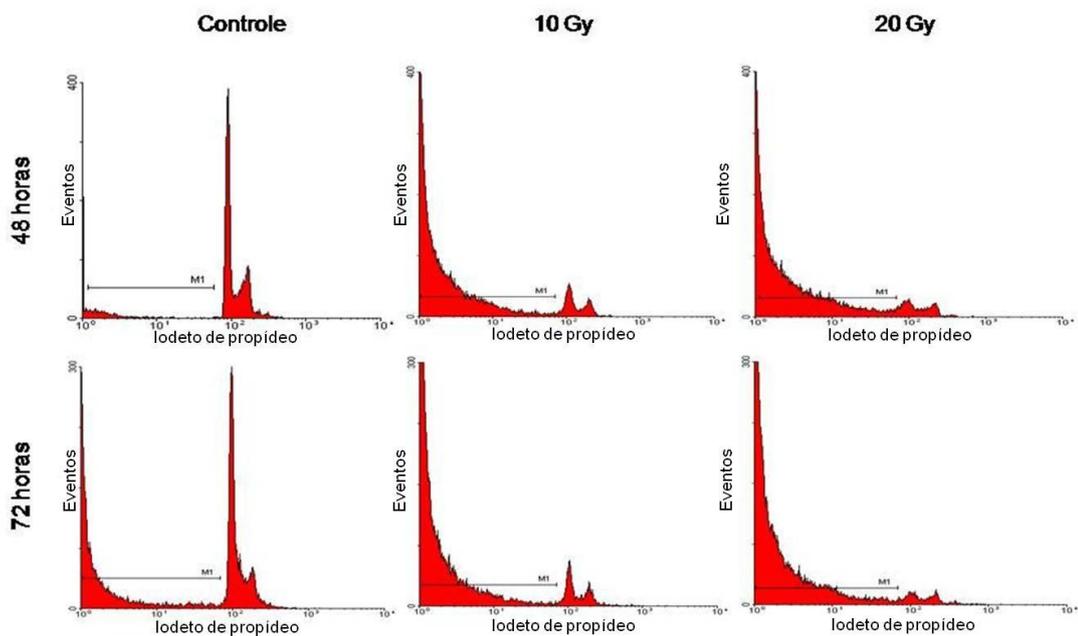


Figura 23 – Distribuição da população de células MDA-MB-231 coradas com iodeto de propídeo após tratamento com RI (10 ou 20 Gy). Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo realizada 48 e 72 h após a irradiação.

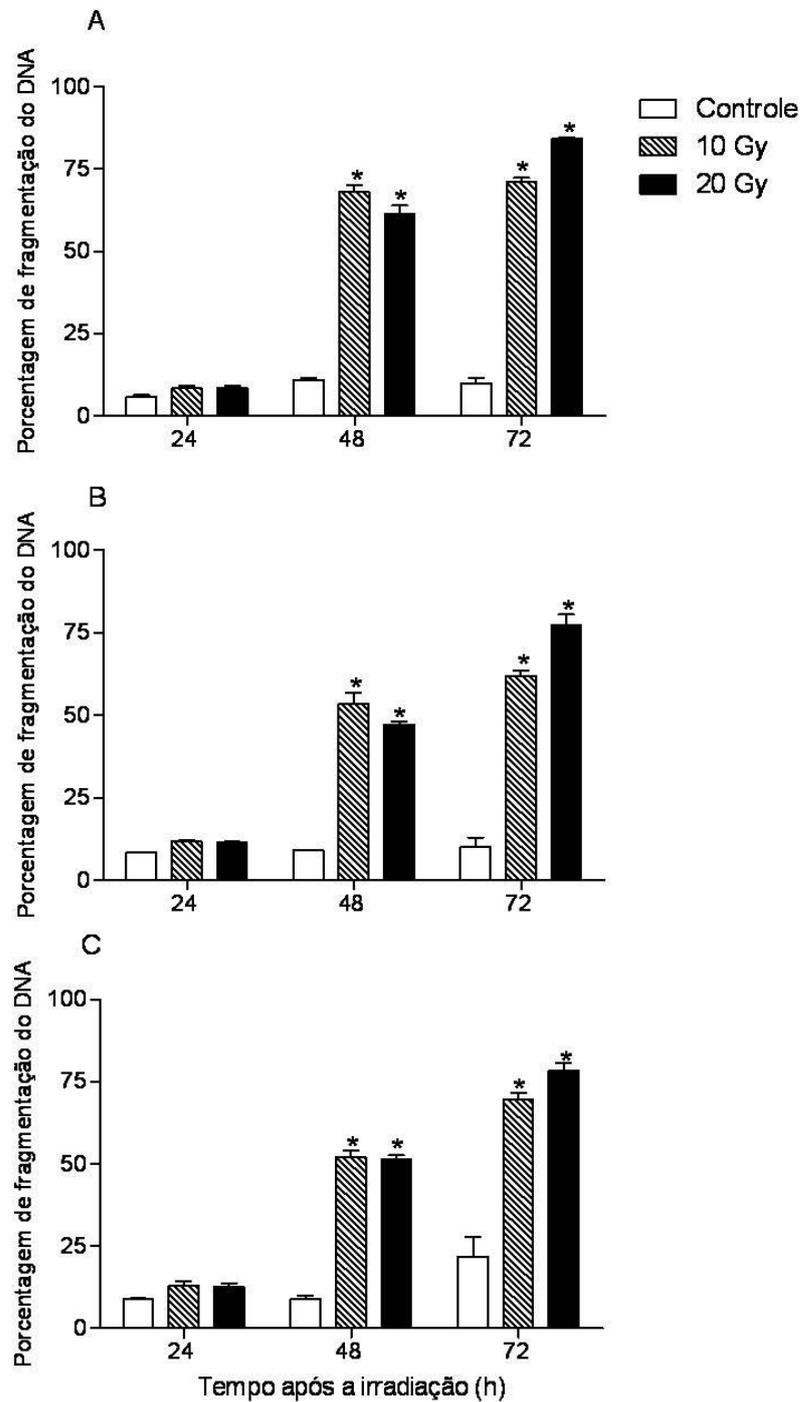


Figura 24 – Fragmentação do DNA em células MACL-1 (A), MGSO-3 (B) e MDA-MB-231 (C) induzida pela RI (10 ou 20 Gy). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.5 Exposição de fosfatidilserina induzida pela radiação γ

Uma vez que o tratamento com RI reduziu o metabolismo celular e induziu morte celular, foi realizado um ensaio que avalia a exposição de fosfatidilserina para investigar se essas alterações celulares estavam associadas à ocorrência de apoptose ou necrose. As células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 foram tratadas (20 Gy) e avaliadas após 48 horas. A concentração das células dos grupos controle no quadrante inferior esquerdo nos gráficos de pontos indica que essas populações não foram significativamente marcadas por anexina V-FITC ou PI. Nos grupos tratados com 20 Gy, foi observado deslocamento da população para os quadrantes superior esquerdo, inferior direito e superior direito. Esse deslocamento está relacionado ao aumento da marcação dessas células com PI, anexina V-FITC e anexina V-FITC + PI, respectivamente (Figura 25 A). A quantificação das células nos quadrantes dos gráficos de pontos foi realizada no programa Cell Quest e apresentada na figura 25 B.

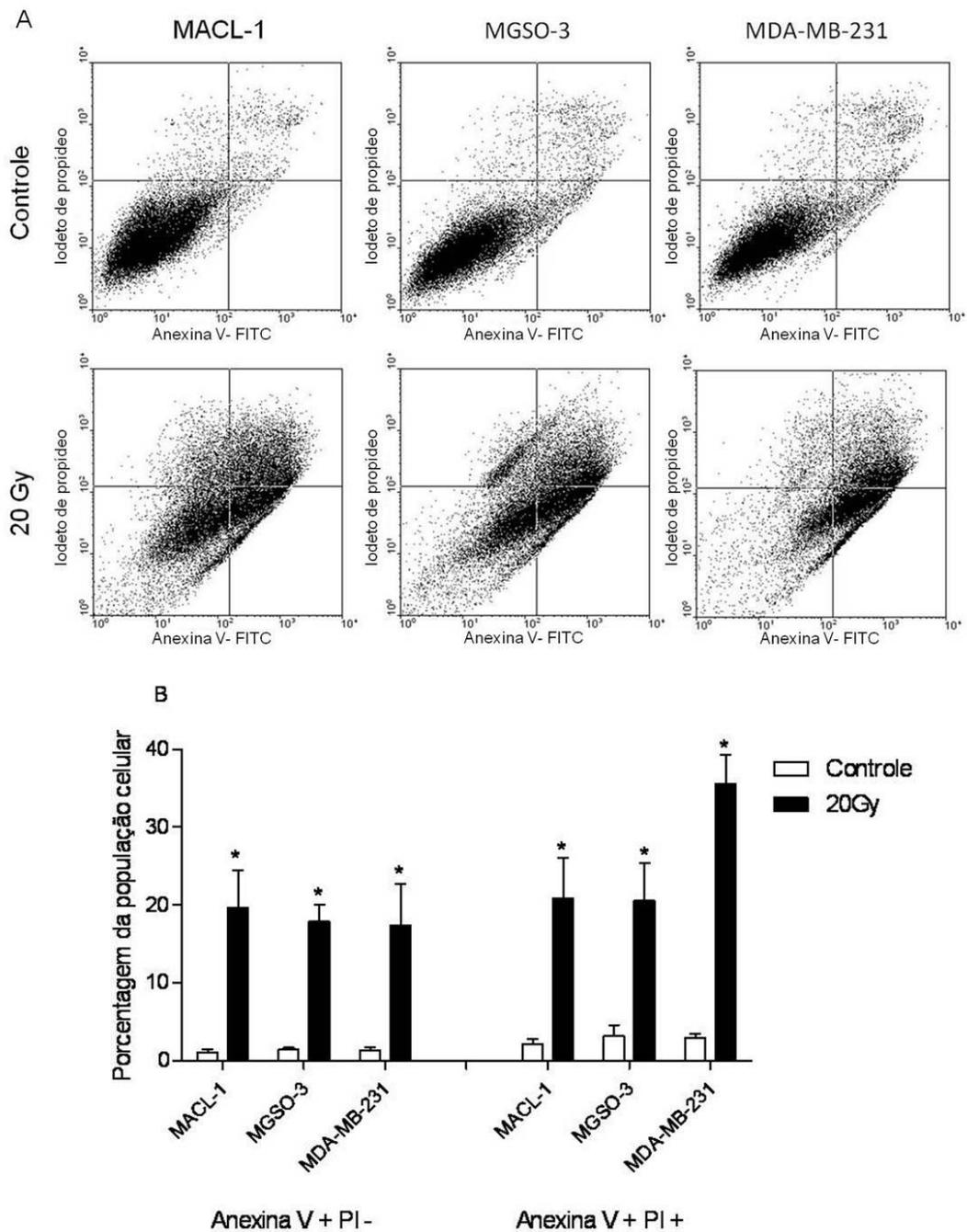


Figura 25 – Exposição de fosfatidilserina em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 48 horas após o tratamento com RI (20 Gy). (A) Gráficos de pontos representativos de células coradas com anexina V-FITC e PI. (B) Porcentagem de células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 marcadas com anexina V-FITC ou anexina V-FITC e PI. Resultados expressos como porcentagem de células marcadas de um total de 20.000 eventos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.6 Envolvimento de caspases nos efeitos induzidos pela radiação γ

A fim de investigar o envolvimento de caspases na citotoxicidade induzida pela RI, as células foram pré-tratadas com o inibidor de caspases zVAD-FMK (80 μ M, 1h). Como demonstrado na figura 26, o tratamento com zVAD-FMK inibiu, significativamente, a redução de viabilidade celular induzida pela RI nas linhagens MACL-1 e MGSO-3, mas não na linhagem MDA-MB-231. O inibidor de caspases também reduziu a fragmentação do DNA nas três linhagens, como demonstrado por meio da quantificação de DNA sub-diplóide 48 horas após o tratamento com 20 Gy (Figura 27).

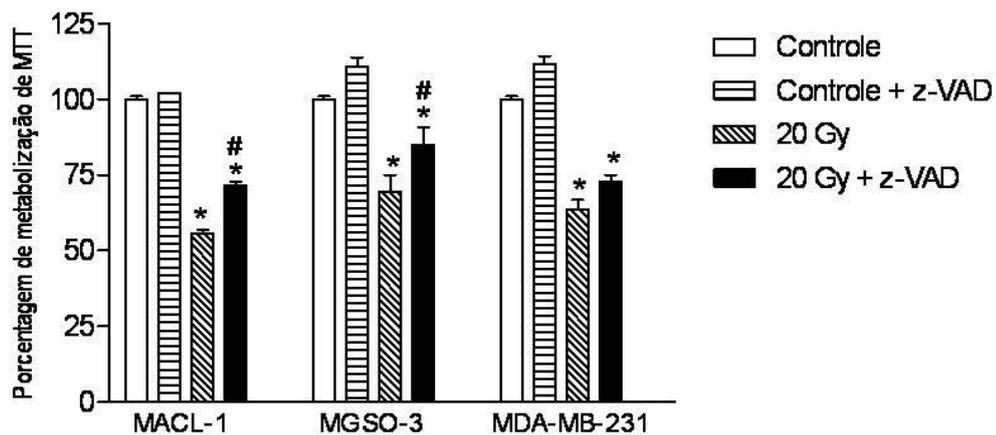


Figura 26 – Efeito induzido pela RI (20 Gy, 48 h) sobre a metabolização de MTT pelas células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 na ausência ou presença de um inibidor de caspases (80 μ M, 1h). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * e #: diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e irradiado (20 Gy), respectivamente ($p < 0,05$).

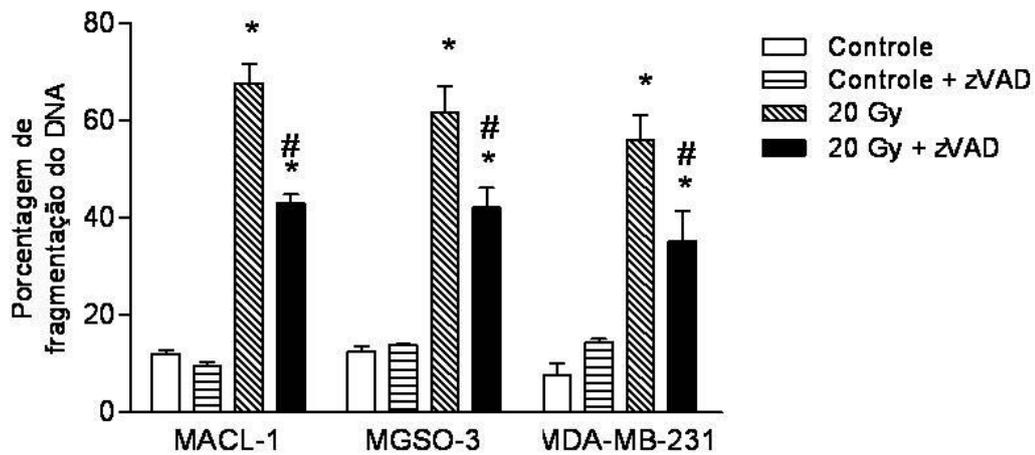


Figura 27 – Fragmentação do DNA em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 induzida pela RI (20 Gy, 48 h) na ausência ou presença de um inibidor de caspases (80 μ M, 1h). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * e #: diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e irradiado (20 Gy), respectivamente ($p < 0,05$).

Uma vez que parte da resposta celular induzida pela RI foi inibida pelo zVAD-FMK, foi investigada a ativação de determinadas caspases após o tratamento com a radiação γ . Inicialmente, avaliou-se a ativação da caspase 8. Nas linhagens MACL-1 e MDA-MB-231 a caspase 8 foi ativada 24 horas após o tratamento com 20 Gy. Nas células da linhagem MGSO-3 foi detectado aumento da atividade dessa caspase 30 horas após o tratamento com RI (Figura 28).

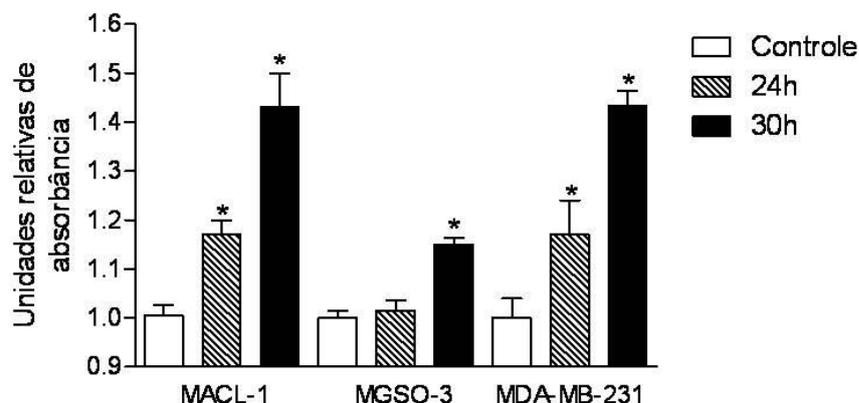


Figura 28 – Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a atividade de caspase 8 em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 24 e 30 horas após o tratamento. Foram usados 200 μ g proteínas de extrato total para detectar a atividade de caspase 8 a partir da clivagem do substrato IETD- p NA. O resultado foi expresso como unidades relativas de absorvância em relação ao grupo controle. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes (duas réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Também foi avaliada a atividade de caspase 9. Vinte e quatro horas após o tratamento com 20 Gy, houve ativação de caspase 9 nas linhagens MACL-1 e MDA-MB-231. A atividade de caspase 9 manteve-se 30 horas após o tratamento nas células dessas linhagens. Nas células da linhagem MGSO-3 não houve atividade de caspase 9 superior àquela do grupo controle nos momentos avaliados (Figura 29).

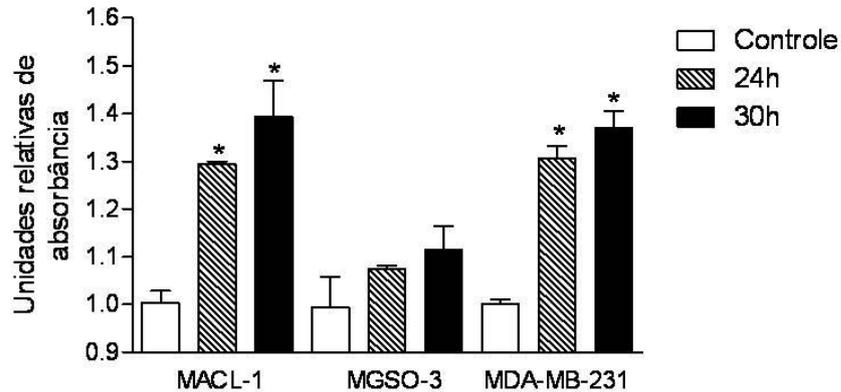


Figura 29 – Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a atividade de caspase 9 em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 24 e 30 horas após o tratamento. Foram usados 200 µg proteínas de extrato total para detectar a atividade de caspase 9 a partir da clivagem do substrato LEHD-*p*NA. O resultado foi expresso como unidades relativas de absorbância em relação ao grupo controle. Os resultados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes (duas réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Na via da apoptose, as caspases 8 e 9 são consideradas ativadoras de uma caspase efetora, a caspase 3. Portanto, foi avaliada a atividade dessa caspase 30 horas após o tratamento com 20 Gy. Nos grupos tratados com RI houve aumento significativo da porcentagem de células com caspase 3 ativa quando comparados com os grupos não irradiados nas linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 (Figura 30).

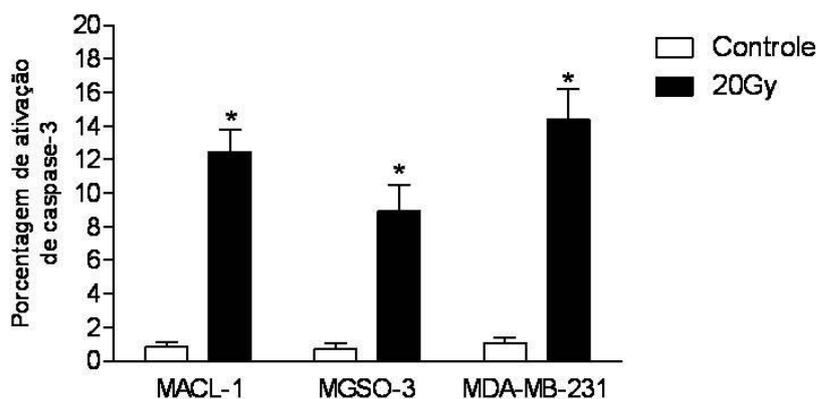


Figura 30 – Efeito induzido pela RI (20 Gy) sobre a atividade de caspase 3 em células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 30 horas após o tratamento. O resultado foi expresso como porcentagem de células marcadas de um total de 30.000 eventos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.7 Avaliação da expressão protéica por eletroforese bidimensional após tratamento com radiação γ

A fim de avaliar se o tratamento com a RI alterou o perfil de expressão protéica foram usadas as técnicas de 2D e 2D-DIGE. Os géis foram preparados a partir de amostras de extratos protéicos de células da linhagem MDA-MB-231 tratadas ou não com radiação γ (20 Gy). Os extratos usados foram obtidos 24 ou 30 horas após o tratamento uma vez que nesses momentos foram observadas respostas celulares indicativas de citotoxicidade nas células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231. A sobreposição das imagens de géis 2D-DIGE (Figuras 31 e 32) permite observar que, 24 horas após o tratamento, o padrão de expressão protéica das células tratadas com RI não difere daquele das células não irradiadas. Além disso, a análise pelo programa Image Master 2D Platinum 6.0 não demonstrou diferenças entre a composição dos extratos de células controle ou tratadas com RI. De forma semelhante, 30 horas após o tratamento com 20 Gy, não foram identificadas

alterações na expressão protéica nas células irradiadas em relação às células controle (Figuras 33 e 34).

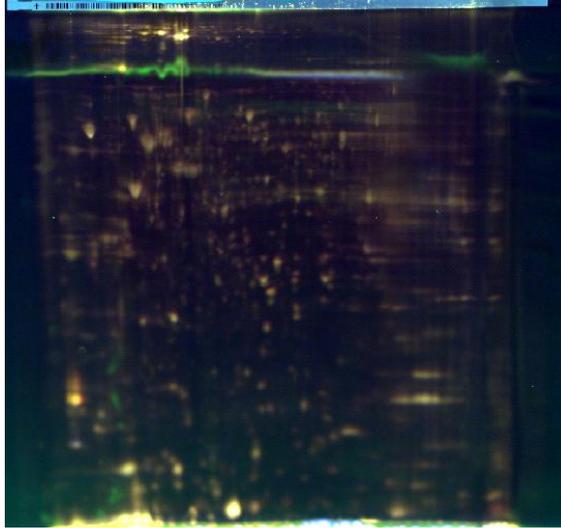


Figura 31 – Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231 controle (Cy 3) e tratado (Cy 5; 20 Gy, 24h) obtido por 2D-DIGE. A imagem corresponde à sobreposição da imagem desses géis com aquela do padrão interno, marcado com Cy2.

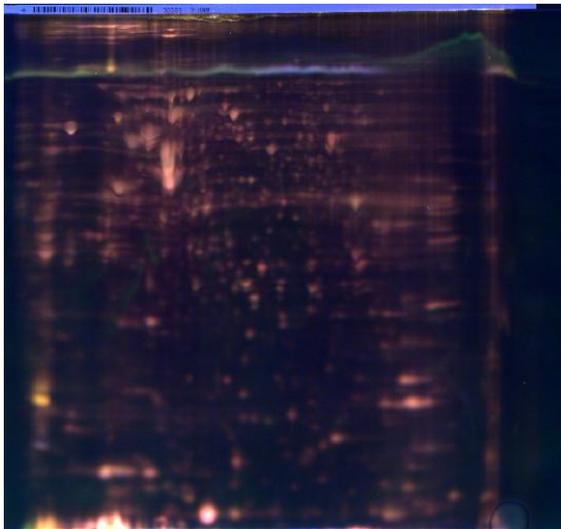


Figura 32 – Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231 controle (Cy 5) e tratado (Cy 3; 20 Gy, 24h) obtido por 2D-DIGE. A imagem corresponde à sobreposição da imagem desses géis com aquela do padrão interno, marcado com Cy2.

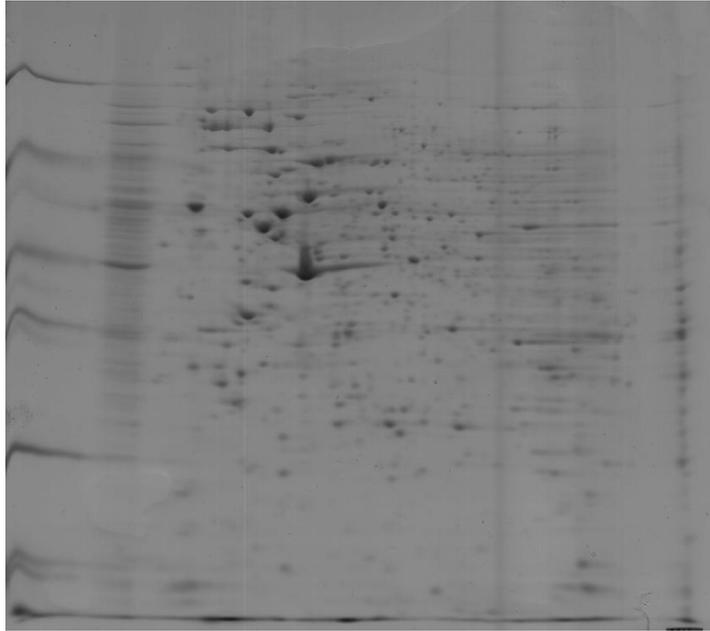


Figura 33 – Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231.

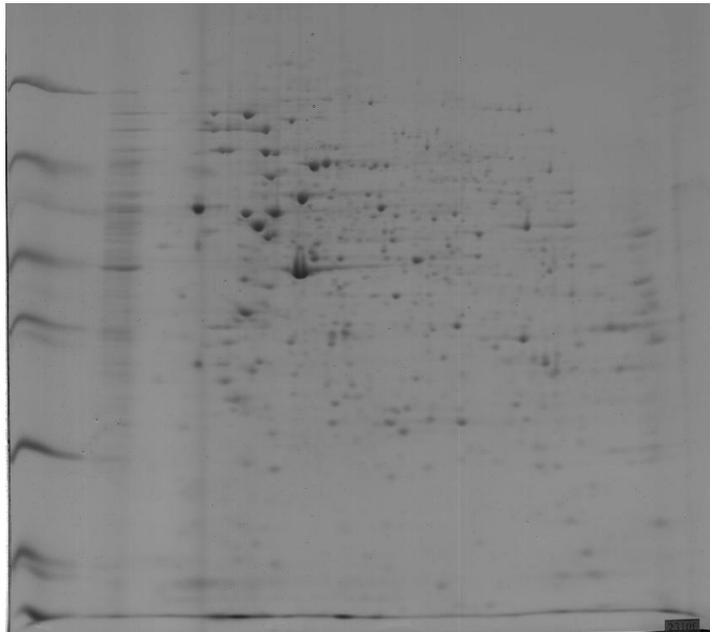


Figura 34 – Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MDA-MB-231 obtido 30 horas após o tratamento com RI (20 Gy).

4.8 Análise comparativa do perfil de expressão protéica de células de tecido de mama saudável e das linhagens MACL-1 e MGSO-3

Também foi avaliada a existência de diferenças na expressão protéica de células das linhagens MACL-1 e MGSO-3 em relação a células de tecido não tumoral por meio de 2D-DIGE. A análise dos géis realizada com o programa DeCyder 2D 7.0 indicou a existência de 50 proteínas diferencialmente expressas entre as células de tecido saudável e as células da linhagem MACL-1. A figura 35 corresponde ao gel 2D-DIGE contendo extratos protéicos da linhagem MACL-1 e das células obtidas a partir de tecido de mama saudável. Na tabela 4 estão relacionadas as proteínas identificadas por espectrometria de massa. Nas figuras 36 e 37 estão representados resultados das proteínas galectina 1 e anexina V, respectivamente, que tiveram expressão alterada nas células MACL-1 em relação às células saudáveis. Foram incluídos os gráficos de tendência, a imagem do spot como observado no gel após coloração com comassie coloidal e o gráfico tridimensional que representa a densidade óptica detectada pelo programa DeCyder 2D 7.0.

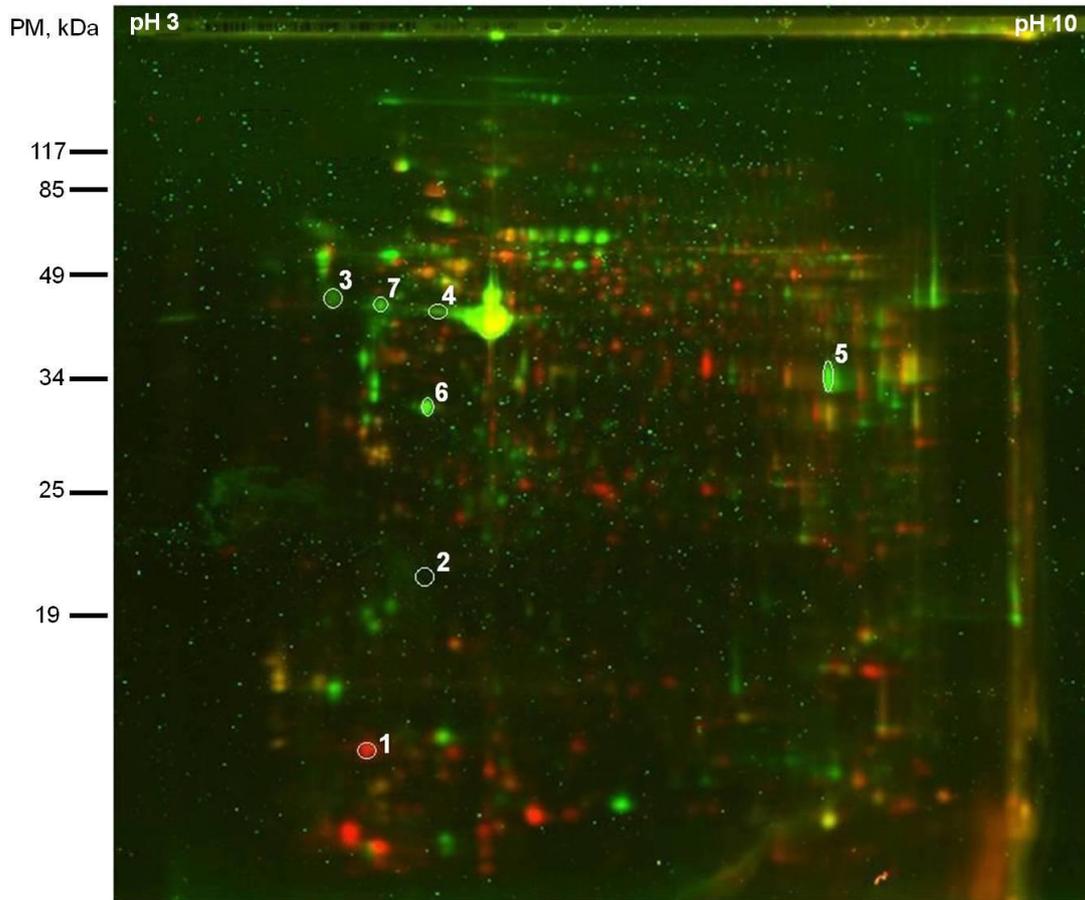


Figura 35 – Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MACL-1 (Cy5) e células saudáveis (Cy3) obtido por 2D-DIGE. A imagem corresponde à sobreposição da imagem desses géis com aquela do padrão interno, marcado com Cy2. Os números indicam a posição das proteínas identificadas por espectrometria de massa.

Tabela 4 – Proteínas identificadas com expressão diferente entre células MACL-1 e de tecido de mama saudável.

Proteína		Função	Seqüência de peptídeos MS/MS	Nível de expressão em relação à célula saudável	Razão
1	Galectina 1	Adesão das células a glicoconjugados (laminina)	KDSNNLCLHFNP + Carbamidomethyl (C)	Aumentada	56,99
2	Cadeia leve da miosina 2	Motilidade celular	GNFNYVEFT KGNFNYVEFT	Reduzida	-2,48
3	Calumenin	Enovelamento e direcionamento de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático	WIYEDVE DWILPSDYDHAEAEA	Reduzida	-4,96
4	Actina α 1	Motilidade celular	AVFPSIVGRP IWHHTFYNEL SYELPDGQVITIGNE	Reduzida	-2,28
5	Anexina A2	Proteína ligadora de fosfolípide dependente de Ca^{2+}	SLYYYIQQDTK GVDEVTIVNILTN	Reduzida	-10,29
6	Anexina V	Anticoagulante	SEIDLFNI GTVTDFPGFDE GLGTDEESILTLTTS WGTDEEKFITIFGT	Reduzida	-7,33
7	Vimentina	Componente do citoesqueleto	ISLPLPNFSSLNLR	Reduzida	-7,81

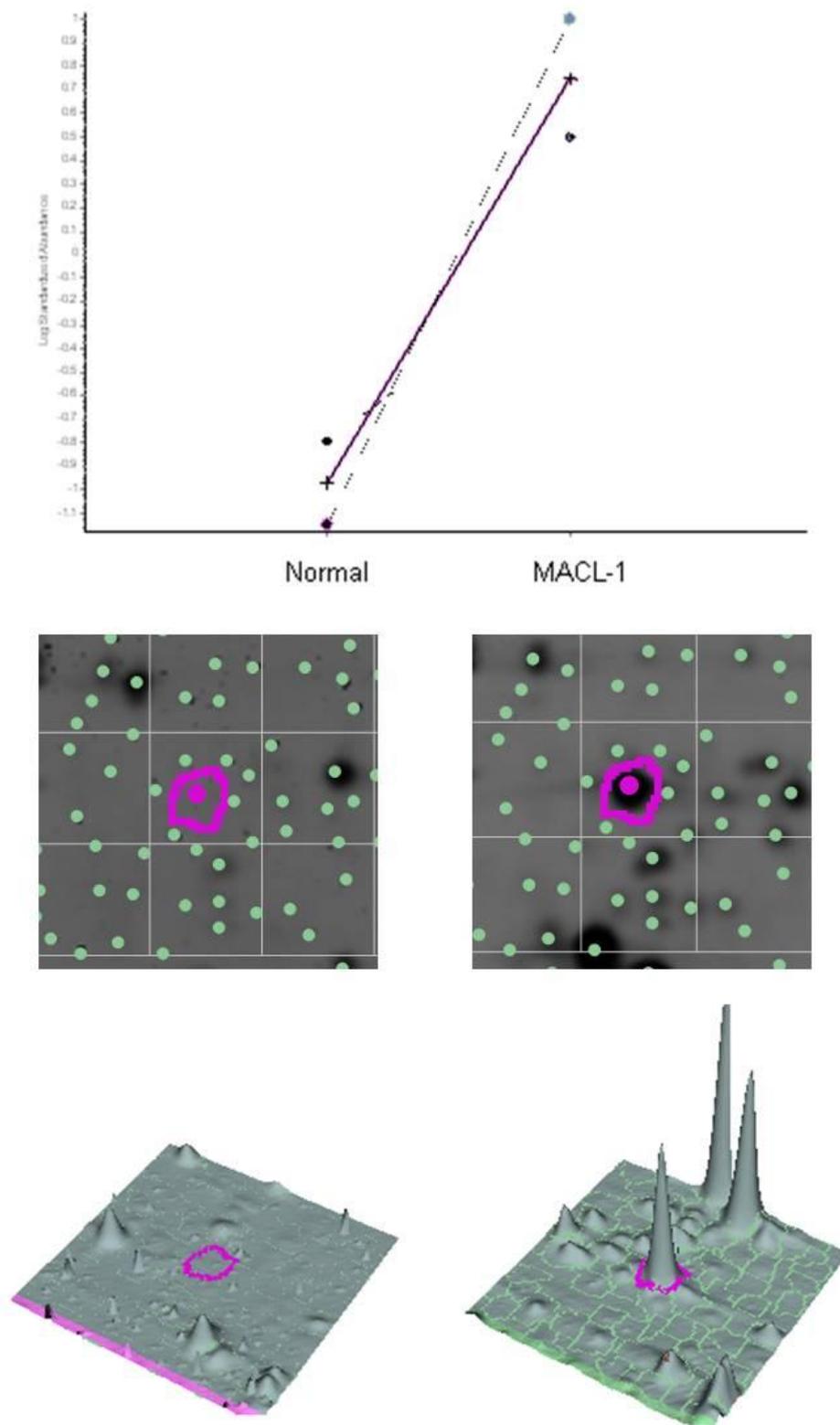


Figura 36 – Gráfico de tendência, imagem do spot e gráfico tridimensional da proteína galectina 1 que teve expressão aumentada nas células MACL-1.

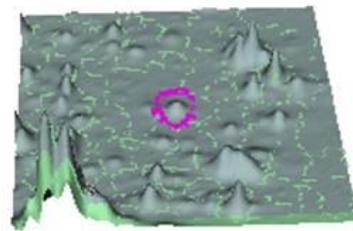
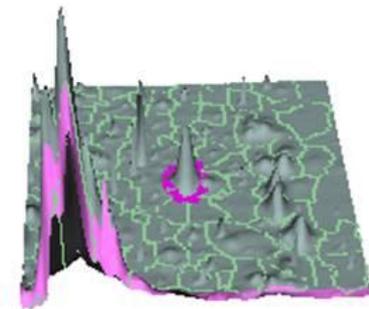
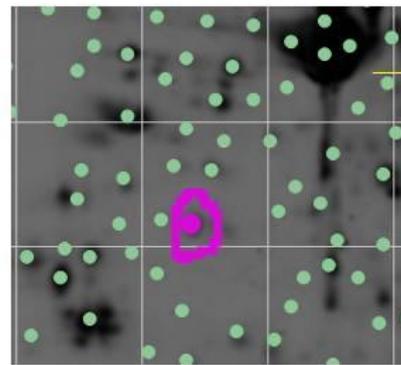
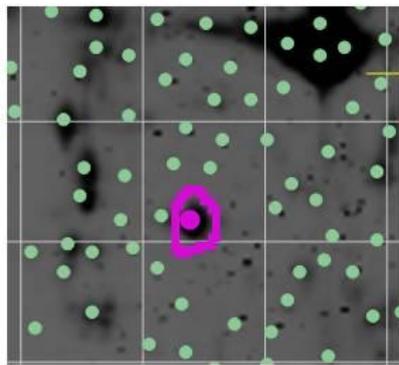
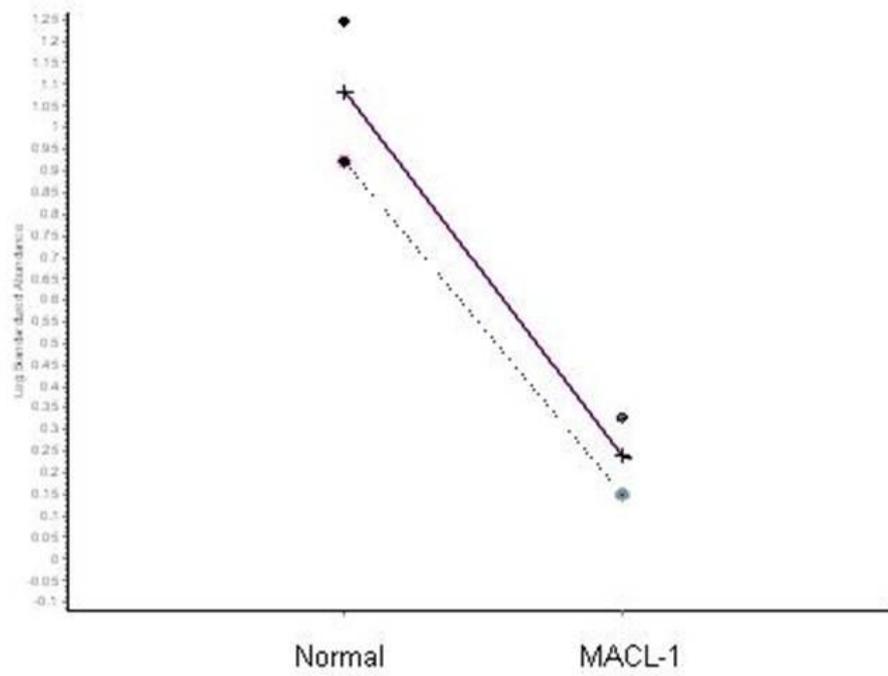


Figura 37 – Gráfico de tendência, imagem do spot e gráfico tridimensional da proteína anexina V que teve expressão reduzida nas células MACL-1.

Entre as células da linhagem MGSO-3 e as células saudáveis, a análise do gel 2D-DIGE (Figura 38) com o programa DeCyder apontou a existência de 57 proteínas com expressão diferencial. Uma dessas proteínas foi identificada como HSP 27 (seqüência de peptídeos MS/MS: LFDQAFGLP) (Figura 39). Sua expressão está aumentada em relação às células de mama saudável (razão: 8,52) e sabe-se que essa proteína está envolvida na resistência a diferentes tipos de estresse celular.

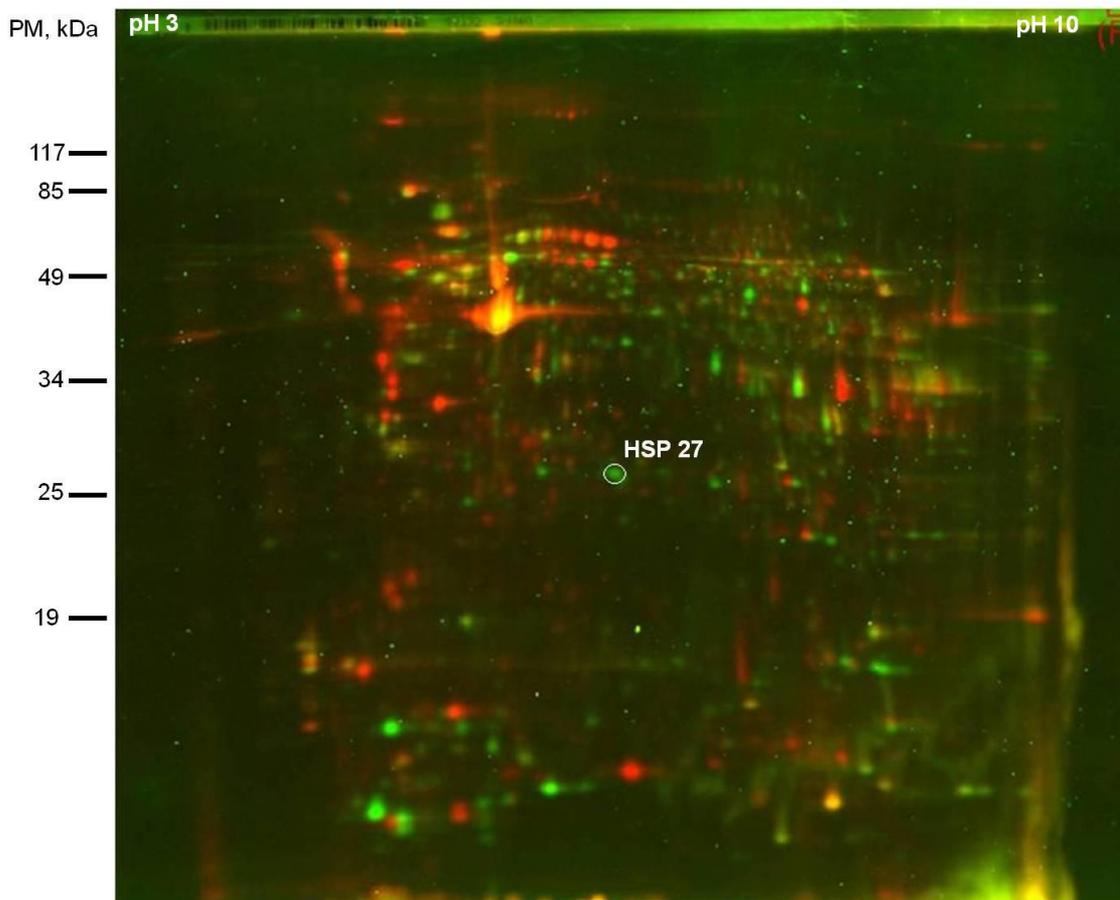


Figura 38 – Gel bidimensional representativo de extrato protéico de células da linhagem MGSO-3 (Cy3) e células saudáveis (Cy5) obtido por 2D-DIGE. A imagem corresponde à sobreposição da imagem desses géis com aquela do padrão interno, marcado com Cy2.

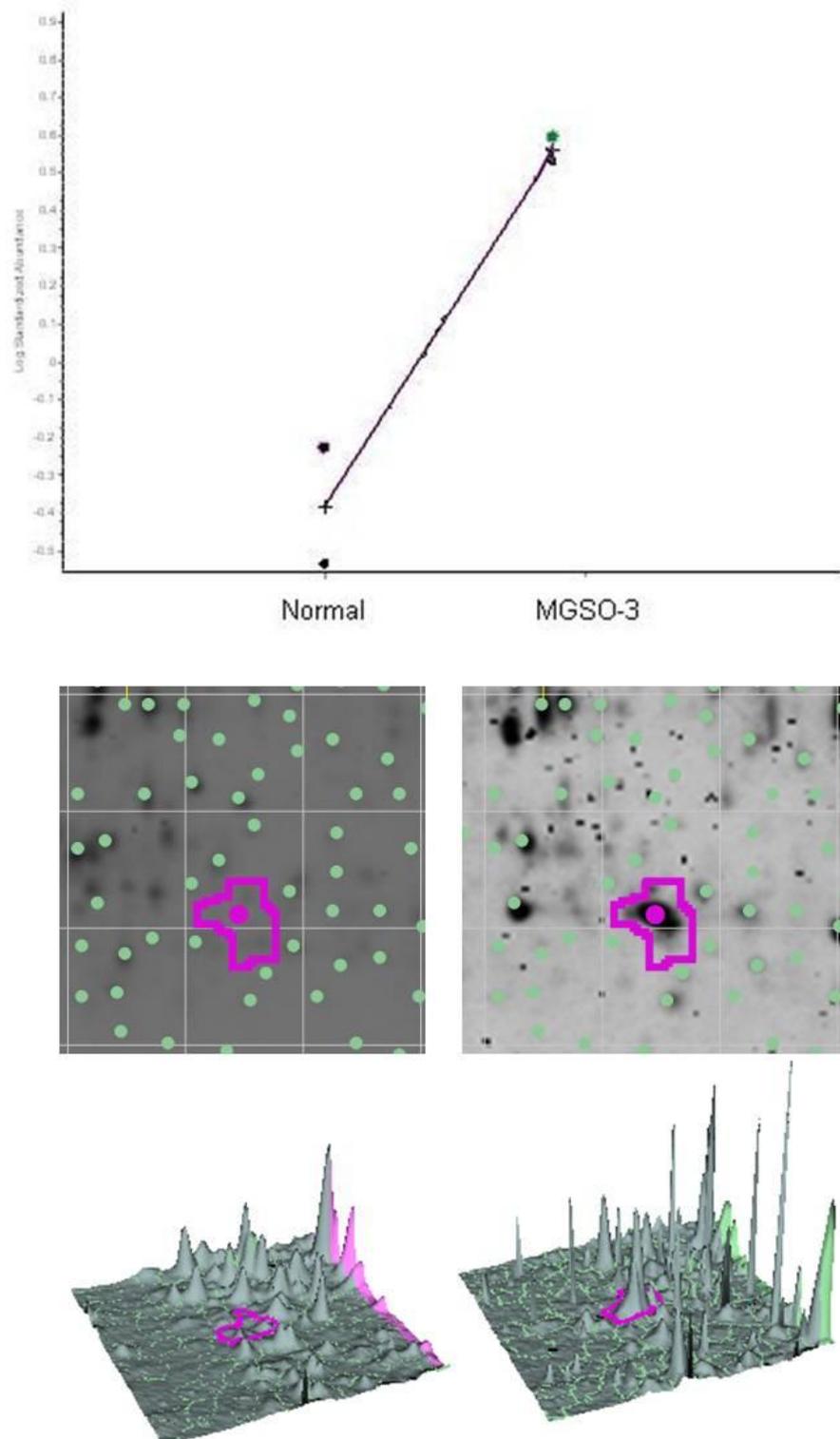


Figura 39 – Gráfico de tendência, imagem do spot e gráfico tridimensional da proteína HSP 27 que teve expressão aumentada nas células MGSO-3.

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama afeta cerca de 470.000 mulheres a cada ano em todo o mundo. No Brasil, são cerca de 50.000 novos casos ao ano (ESTIMATIVA 2010). Esse tipo de câncer, normalmente, não produz sinais ou sintomas nos estágios iniciais, quando o tumor ainda é pequeno e de mais fácil controle. Por essa razão, muitas pacientes demoram a ser diagnosticadas, fator que reduz drasticamente a chance de cura. Porém, graças a estratégias de rastreamento populacional, tem sido cada vez maior o número de mulheres que tem recebido tratamento precocemente. Isso tem se refletido na redução gradual da taxa de mortalidade por câncer de mama nos últimos 25 anos em muitos países da Europa e na América do Norte (WCR_2008).

Entretanto, no Brasil, a taxa de mortalidade continua elevada. O Ministério da Saúde preconiza que seja realizado exame mamográfico a cada dois anos em mulheres de 50 a 69 anos. De 40 a 49 anos de idade é sugerido apenas o exame clínico anual das mamas. Além disso, independente da faixa etária, o exame clínico deve ser realizado em todas as mulheres atendidas no serviço de saúde. Essa estratégia de rastreamento muitas vezes não permite o diagnóstico precoce, colaborando para a manutenção da alta taxa de mortalidade por câncer de mama no Brasil uma vez que a demora no diagnóstico compromete a eficácia do tratamento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2004).

Uma das principais limitações da terapia do câncer de mama em estágios avançados é o risco de remoção incompleta do tumor. Nesses casos, a eficácia do tratamento complementar torna-se crucial para a cura da paciente, evitando recorrência da doença. Porém, em diferentes tipos de câncer (Mullighan *et al*, 2008; Nguyen *et al*, 2008; Du Bois *et al*, 2009) incluindo o câncer de mama (Canello *et al*, 2010; Yu *et al*, 2010) foi observada a recorrência de tumores por falhas das terapias

atualmente disponíveis. No câncer de mama essa realidade muitas vezes torna ineficazes tratamentos como a radioterapia (Valachis *et al*, 2010). Portanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na morte e sobrevivência de células tumorais após o tratamento é um ponto chave no desenvolvimento de terapias mais eficazes. Linhagens celulares derivadas de tumores primários são amplamente usadas nesse tipo de pesquisa, uma vez que apresentam inúmeras vantagens do ponto de vista experimental (Vargo-Gogola, Rosen, 2007).

Em geral, as linhagens de câncer de mama são culturas de fácil manutenção. Além disso, permitem manipulações genéticas e são consideradas um modelo de câncer mais relevante do que aqueles desenvolvidos em animais. Em consequência, o uso de linhagens celulares derivadas de câncer de mama humano tem fornecido um grande volume de informações a respeito de genes e vias de sinalização envolvidos no desenvolvimento, na proliferação e na sobrevivência de células tumorais. Entretanto, uma linhagem celular não é representativa da diversidade de alterações genéticas e fenotípicas envolvidas na geração dos tumores de mama (Vargo-Gogola, Rosen, 2007). Tal fator justifica o uso de diferentes linhagens celulares em um estudo a fim de validar a relevância das observações realizadas (Burdall *et al*, 2003). No presente estudo foram usadas duas linhagens de câncer de mama humano estabelecidas em nosso laboratório a partir de tumores primários, MACL-1 e MGSO-3 (Correa *et al*, 2009), e uma linhagem comercial derivada de metástase, MDA-MB-231 (Cailleau *et al*, 1974).

Apesar de serem consideradas como bom modelo para o estudo da biologia do câncer de mama, as linhagens celulares trazem algumas limitações. Por exemplo, as células em cultura não estão inseridas em uma estrutura tridimensional. Elas formam uma monocamada e não existem outros tipos celulares adjacentes, como ocorre no tumor *in vivo*. Portanto, não há barreira para a exposição das células a fármacos e à radiação, o que dificulta a interpretação dos resultados. A fim de minimizar a interferência desses aspectos nos resultados dos experimentos realizados, a dose de radiação usada no presente estudo foi definida com base em estudos clínicos de radioterapia intraoperatória (Luini *et al*, 2005).

Nesse tratamento, a paciente recebe uma dose de radiação entre 15 e 21 Gy diretamente no sítio do tumor durante o procedimento cirúrgico (Veronesi *et al*, 2005; Kraus-Tiefenbacher *et al*, 2007; Chadha *et al*, 2009; Lemanski *et al*, 2009). Essa dose única de cerca de 20 Gy equivale à dose total de 60 Gy, administrada em frações diárias de 2 Gy, cinco dias por semana durante seis semanas, esquema de tratamento freqüentemente usado na radioterapia após a remoção cirúrgica do tumor (Luini *et al*, 2005). Portanto, no presente estudo, as culturas celulares foram irradiadas com a dose de 20 Gy e com uma dose inferior, de 10 Gy, a fim de simular os efeitos induzidos pela radioterapia.

Sabe-se que a morte celular resultante da exposição à RI está relacionada aos danos celulares induzidos por esse tipo de energia. A interação da radiação com as biomoléculas induz danos diretos. Entretanto, grande parte das lesões celulares promovidas pela irradiação está associada à geração de espécies reativas de oxigênio pela interação da radiação com as moléculas de água, fenômeno conhecido como radiólise da água. As espécies reativas de oxigênio danificam diversas biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos (Choi *et al*, 2007; Mozdarani *et al*, 2007), resultando em fragmentação do DNA, bloqueio do ciclo celular e apoptose (Kim *et al*, 2004). Desse modo, a fim de investigar os efeitos da radiação sobre as células de câncer de mama das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 foram realizados diferentes ensaios.

Inicialmente, foram avaliados efeitos agudos da RI sobre o metabolismo celular por meio do ensaio de MTT. Estudos demonstram que há redução da atividade metabólica de diferentes tipos celulares após o tratamento com RI (Eriksson *et al*, 2007; Jiao *et al*, 2007; Hayashi *et al*, 2008). No presente estudo foi observada redução da metabolização do MTT 48 e 72 horas após o tratamento com RI. Essa alteração foi de pequena magnitude e não foi significativa na linhagem MDA-MB-231 72 horas após a exposição à radiação γ . É provável que a redução do metabolismo celular resulte de danos induzidos pela RI em biomoléculas. De fato, quando foi avaliado o conteúdo de DNA nas três linhagens após esquema de tratamento similar, observou-se aumento significativo da fragmentação do material genético 48 e 72 horas após o tratamento com 10 e 20 Gy.

O ensaio de fragmentação de DNA pode ser usado para a avaliação de morte celular induzida por diferentes tipos de estímulos: químicos (Mcneill-Blue *et al*, 2006; Gahr *et al*, 2008; Ramakrishnan *et al*, 2009), biológicos (Schoier *et al*, 2001) ou físicos (Tokalov *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2008). O aumento da fragmentação do DNA observado no presente estudo pode ser interpretado como morte celular (Nicoletti *et al*, 1991; Lecoecur, 2002) e está de acordo com a redução de metabolismo de MTT observada 48 e 72 horas após o tratamento.

Também foi realizado o ensaio de clonogenicidade o qual avalia a capacidade de células que sobreviveram ao tratamento com RI formarem colônias (Franken *et al*, 2006). Esse ensaio tem sido amplamente usado para investigação da manutenção da capacidade de gerar células filhas após o tratamento com RI (Machida *et al*, 2005; Raffoul *et al*, 2006; Jin *et al*, 2007; Gow *et al*, 2008). Nas células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 o tratamento com 10 ou 20 Gy reduziu significativamente a sobrevivência clonogênica. Isso demonstra que células aparentemente íntegras e metabolicamente ativas quando avaliadas 72 horas após o tratamento no ensaio de MTT provavelmente carregavam danos incompatíveis com a manutenção da proliferação celular. É possível que células com danos tenham entrado em senescência e apesar de estarem vivas, perderam a capacidade de se dividir e formar colônia. Esse mecanismo é válido para o controle do câncer uma vez que a célula incapaz de se dividir não é capaz de manter o tumor (Gewirtz *et al*, 2008).

Também é possível supor que as células com danos não reparados no DNA tenham escapado do bloqueio em G₂ e entrado em um tipo anormal de mitose o que, posteriormente, resulta em morte por catástrofe mitótica (Okada, Mak, 2004; Vakifahmetoglu *et al*, 2008; Varmark *et al*, 2009). De fato, a RI pode induzir morte por esse mecanismo (Eriksson *et al*, 2007). Além disso, por meio de microscopia confocal, foram observadas aberrações nos cromossomos 24 horas após o tratamento com 20 Gy. Portanto, é possível que as células com alterações cromossômicas que permaneceram vivas 72 horas após o tratamento com RI tenham morrido ao iniciar novo ciclo de divisão, entrando em processo de catástrofe mitótica.

Apesar desses efeitos citotóxicos induzido pela RI, o tratamento com uma dose de 20 Gy não foi suficiente para eliminar todas as células em cultura. As células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 foram capazes de se recuperar após um tratamento com 20 Gy. Três semanas após o primeiro tratamento com RI as células haviam restabelecido culturas com aspecto e comportamento semelhantes ao das culturas que não foram expostas à radiação. Essas células recuperadas foram tratadas com 10 ou 20 Gy e a redução do metabolismo de MTT induzida por esse novo tratamento não diferiu daquela observada nas culturas que estavam sendo tratadas pela primeira vez. Esse resultado sugere que as linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 apresentam certo grau de resistência à RI.

Entretanto, esse resultado aparentemente contradiz aquele obtido com o ensaio de clonogenicidade no qual não foi observado crescimento de colônias 10 dias após o tratamento com a dose de 20 Gy. É possível supor que essa divergência resulte da diferença entre os protocolos experimentais realizados. No ensaio de clonogenicidade, após o tratamento as células foram coletadas dos frascos de cultura e inoculadas em densidades conhecidas (100 a 600 células) em placas de seis poços. Dessa maneira, partindo-se de um número pré-determinado de células irradiadas, pode ser realizada uma análise quantitativa da fração de células capazes de gerar células filhas. Por sua vez, no ensaio de recuperação de células após a irradiação, cerca de 100.000 células foram irradiadas e todas foram mantidas em cultura após o tratamento. Portanto, nesse protocolo, parte-se de um número maior de células irradiadas e isso aumenta a probabilidade de que sejam detectadas células capazes de sobreviver ao tratamento com RI. Com base nesse resultado, pode-se sugerir que as células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 dispõem de mecanismos que permitem reparar os danos causados pela exposição à radiação γ ou sobreviver na presença desses danos sendo, portanto, resistentes a esse tratamento.

Sabe-se que a resistência à radioterapia representa um importante fator limitante na terapia do câncer de mama uma vez que a sobrevivência de parte das células tumorais resulta em recorrência do tumor (Wolfort *et al*, 2006). Um dos fatores que determinam a sensibilidade à radiação é a regulação da transição entre as fases do

ciclo celular uma vez que esta afeta o processo de reparo do DNA. Em geral, células capazes de estabelecer bloqueio prolongado do ciclo celular após exposição à RI são mais aptas a sobreviver aos danos induzidos por esse tratamento (Coucke, Crompton, 1995). Entre as diversas vias de sinalização envolvidas no controle do ciclo celular a via da p53 é uma das principais responsáveis pelo bloqueio que ocorre na presença de DNA danificado (Houtgraaf *et al*, 2006) o qual parece estar relacionado à ativação de ATM e Chk2 cinase (Lazzaro *et al*, 2009).

Por sua vez, a transição G₂/M também pode ser alterada pela RI. As proteínas ATM e ATR detectam danos no DNA e ativam as quinases Chk2 e Chk1, respectivamente. Essas proteínas fosforilam diferentes proteínas reguladoras do ciclo celular e estabelecem o bloqueio em G₂ o que resulta no atraso da transição entre as fases G₂ e M (Lazzaro *et al*, 2009). O bloqueio do ciclo celular em G₂ tem o objetivo de permitir que ocorra o reparo do DNA antes do prosseguimento da divisão celular. Dessa forma, reduz-se o risco de DNA danificado ou de cromossomos segregados de forma inadequada serem transmitidos para células filhas (Kao *et al*, 2001). No presente estudo foi observado que, 24 horas após o tratamento com 10 ou 20 Gy, as células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 apresentaram bloqueio do ciclo celular na transição entre as fases G₂ e M apesar de não ter sido observada alteração no metabolismo celular ou na porcentagem de células com DNA fragmentado nesse momento.

A fim de avaliar em qual fase ocorreu o bloqueio do ciclo foi calculado o índice mitótico. Essa quantificação foi realizada por meio do uso de um anticorpo anti-histona-3-fosforilada. A proteína histona 3 é fosforilada durante a mitose sendo que a intensidade da fosforilação e, conseqüentemente, da fluorescência observada por meio da ligação do anticorpo, aumenta gradativamente até a prófase e está praticamente extinta na telófase (Hendzel *et al*, 1997). A observação de campos de microscopia confocal com células não marcadas pelo anticorpo anti-fosfo-histona-3 e com diferentes figuras mitóticas marcadas por esse anticorpo demonstra a seletividade do mesmo e sua aplicabilidade em ensaios para identificação e quantificação de células em mitose (Bossard *et al*, 2006; Veras *et al*, 2009).

A visualização por microscopia confocal dos núcleos celulares 24 horas após o tratamento com 20 Gy permitiu observar que não houve aumento significativo do número de células em mitose nas células MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231. Esse resultado sugere que o bloqueio do ciclo induzido pela RI ocorreu antes da transição para a fase M. Portanto, as células com conteúdo de DNA 4n observadas 24 horas após o tratamento com 20 Gy encontravam-se na fase G₂ do ciclo celular.

Também foi possível observar que a RI provocou alterações na morfologia dos cromossomos nas células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 24 horas após o tratamento com 20 Gy. Os danos ao DNA resultantes da exposição à RI funcionam como estímulo químico para ativação de diversas respostas celulares. A RI induz trocas de bases e quebras simples e duplas no material genético sendo as quebras duplas do DNA o tipo de lesão mais relevante. A fragmentação do DNA ocorre, portanto, devido à ação direta da radiação sobre o ácido nucléico (Blocher, 1988; Schmidberger *et al*, 2003) e pela ativação de vias de apoptose e de endonucleases após a detecção desses danos (Gulston *et al*, 2004).

Uma vez que o tratamento com RI induziu morte celular, foram investigados os mecanismos envolvidos. Sabe-se que lesões no DNA, como aquelas induzidas pela RI, podem ativar vias de apoptose (Yarnold, 1997). Portanto, inicialmente, foi avaliada a porcentagem de células que apresentavam características de células apoptóticas 48 horas após o tratamento com 20 Gy. Uma das alterações celulares mais precoces observadas em células apoptóticas é a exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática. A fosfatidilserina é um fosfolípide encontrado na face interna da membrana de células viáveis e, quando exposta na superfície externa de células apoptóticas, funciona como sinal para macrófagos que fagocitam essas células (Fadok *et al*, 1992).

Outra característica de células em estágios iniciais de apoptose é a manutenção da integridade da membrana e a capacidade de excluir corantes como o PI (Aubry *et al*, 1999). No presente estudo, foi observado que 48 horas após o tratamento com 20 Gy uma parte da população celular encontrava-se em estágio inicial de apoptose, tendo sido marcada apenas com anexina V. Outra parte da população apresentava-

se marcada com anexina V e PI, caracterizando células em estágio avançado de apoptose ou em necrose. Portanto, parte da morte celular resultante do tratamento com 20 Gy pode ser descrita como apoptótica.

A morte celular por apoptose pode ser iniciada pela via de sinalização extrínseca, mediada por receptor de morte; intrínseca, também denominada via mitocondrial; ou ser mediada por granzima B (Taylor *et al*, 2008). Essas vias ativam uma série de processos bioquímicos nas células que resultam na ativação de caspases, serinoproteases envolvidas na digestão generalizada de proteínas que ocorre durante a apoptose (Okada, Mak, 2004; Dogu, Diaz, 2009). Para avaliar o envolvimento de caspases nos efeitos induzidos pela RI sobre as células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231, foi usado um inibidor geral de caspases, z-VAD-FMK. Esse inibidor de caspases não foi capaz de abolir a fragmentação do DNA e a morte celular induzidas pela RI. Isso pode estar relacionado ao fato de essa substância bloquear a clivagem do DNA e a morte celular iniciadas, diretamente, pela ativação de caspases (Varmark *et al*, 2009).

Portanto, pode-se supor que os efeitos induzidos pela radiação γ sejam, em parte, independentes da ativação de caspases, resultando, por exemplo, da ação direta da radiação sobre o DNA, entre outros mecanismos. Estima-se que cada 1 Gy de radiação induza uma quebra dupla no DNA, um tipo de lesão de difícil reparo (Blocher, 1988; Schmidberger *et al*, 2003). Esse tipo de lesão desencadeia diversos processos celulares entre eles a morte celular e a ativação de endonucleases e exonucleases. Essas enzimas clivam o material genético de forma generalizada e independente de caspases (Lee *et al*, 2005), efeitos da radiação γ não inibidos pelo zVAD. Diferentes estudos também demonstraram que a inibição da apoptose em células que sofreram danos no DNA não altera a sobrevivência clonogênica. Nesses estudos, mesmo havendo redução de marcadores de apoptose, a morte celular ocorreu independente desse mecanismo devido à ativação de vias alternativas que resultam em morte, por exemplo, por catástrofe mitótica (Lock, Stribinskiene, 1996; Kyprianou *et al*, 1997; Ruth, Roninson, 2000; Mansilla *et al*, 2006).

Apesar de não ter abolido as respostas celulares induzidas pela RI, o inibidor de caspases reduziu de forma significativa a fragmentação do DNA e a redução de metabolismo do MTT, o que sugere que há envolvimento de caspases nessas respostas. De fato, a ativação de caspases após o tratamento com RI foi demonstrada por estudos usando linhagens celulares diferentes (Giagkousiklidis *et al*, 2005; Verbrugge *et al*, 2008). Portanto, a ativação de duas caspases iniciadoras foi investigada 24 e 30 horas após o tratamento com 20 Gy. Esses momentos foram selecionados, pois os resultados dos ensaios de MTT e de fragmentação do DNA demonstram que 24 horas após o tratamento não há morte celular significativa. Por outro lado, após 48 horas, houve redução do metabolismo de MTT e cerca de 50% das células apresentavam fragmentação do DNA nas três linhagens usadas.

A caspase 8 foi ativada pelo tratamento com RI nas linhagens MACL-1 e MDA-MB-231, após 24 horas. Na linhagem MGSO-3 a ativação foi observada 30 horas após o tratamento. A via de ativação da caspase 8 mais amplamente estudada envolve receptores de morte da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral, como CD-95 e TRAIL (Ashkenazi, 2002). Existem evidências de que a RI torna mais eficiente esse mecanismo tornando mais fácil a ativação da caspase 8 (Verbrugge *et al*, 2008). Porém, a caspase 8 também pode ser ativada por mecanismos independentes de receptores de morte, em um processo de comunicação entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Jones *et al*, 2001; Vit *et al*, 2001).

A ativação de outra caspase iniciadora, a caspase 9, observada 24 horas após o tratamento com 20 Gy nas linhagens MACL-1 e MDA-MB-231 pode resultar de danos mitocondriais induzidos pela RI. A permeabilização da membrana externa da mitocôndria permite a liberação de citocromo c o qual, quando no citoplasma, interage com Apaf-1 e caspase 9 formando um complexo protéico denominado apoptossomo que promove a ativação de caspase 9 (Okada, Mak, 2004; Dogu, Diaz, 2009). Além disso, a clivagem de BID pela caspase 8 também pode resultar na ativação de caspase 9 (Belka *et al*, 2000). As caspases 8 e 9 são denominadas iniciadoras, pois um de seus principais alvos moleculares é a caspase 3, uma caspase efetora.

A caspase 3, cuja ativação foi demonstrada 30 horas após o tratamento com 20 Gy nas três linhagens estudadas, está envolvida na degradação de diversas estruturas celulares resultando em alterações fenotípicas características da apoptose. A exposição de fosfatidilserina, observada 48 horas após tratamento com RI, é dependente da atividade da caspase efetora 3 (Taylor *et al*, 2008). Além disso, o fator de fragmentação do DNA, uma DNase ativada por caspase 3, promove a clivagem do DNA durante a apoptose (Liu *et al*, 1997 ; Enari *et al*, 1998). No presente estudo, a fragmentação do DNA foi observada 48 horas após o tratamento com radiação γ , posterior à ativação de caspase 3 que ocorreu 30 horas após o tratamento. Portanto, a ativação dessa caspase nas linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 está de acordo com as alterações celulares observadas posteriormente nessas células.

Em conjunto, esses resultados demonstram que a RI induz morte celular a qual, em parte, está relacionada à ativação de vias de apoptose. Entretanto, o fato de as culturas terem se restabelecido três semanas após o tratamento sugere que as células das linhagens MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB-231 possuem mecanismos que permitem sua sobrevivência mesmo após sofrerem danos extensos no material genético. Apesar dos inúmeros avanços, a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa habilidade de células neoplásicas sobreviverem em condições desfavoráveis permanece incompleta. Uma das áreas mais promissoras atualmente que pode contribuir para a superação dessas limitações é a análise proteômica (Hanash, 2003; Abramovitz, Leyland-Jones, 2006).

Após a decodificação do genoma humano, o próximo desafio tem sido estabelecer uma relação entre os genes presentes nas células e as funções desempenhadas pelas proteínas codificadas por eles. Diferentes abordagens podem ser adotadas a fim de alcançar esse objetivo, entre elas o estudo do transcriptoma (conjunto das moléculas de mRNA) e do proteoma. Uma vez que as proteínas são peças centrais da função biológica e importantes candidatas a alvos de fármacos e testes diagnósticos, os estudos proteômicos têm recebido grande atenção (Simpson, 2003, p.1).

Com o objetivo de identificar proteínas possivelmente envolvidas nas respostas celulares induzidas pela RI foram usadas duas técnicas de eletroforese bidimensional: 2D e 2D-DIGE. Inicialmente, foi comparada a expressão protéica de células da linhagem MDA-MB-231 com aquela de células dessa linhagem 24 ou 30 horas após o tratamento com 20 Gy. Nesses protocolos não foram detectadas alterações na expressão protéica. Esse resultado pode resultar de limitações da técnica usada. Uma vez que os géis 2D e 2D-DIGE foram preparados a partir de extrato total de células, pode não ter sido possível detectar alterações de pequena magnitude na expressão protéica após o tratamento com 20 Gy. É possível que a análise de frações do extrato celular aumente a sensibilidade permitindo, assim, a identificação de proteínas cuja expressão sofre interferência do tratamento com RI. Além disso, essa análise pode ser realizada em diferentes momentos após o tratamento com RI estabelecendo, assim, um estudo da cinética da alteração do perfil proteômico.

Apesar de não terem sido detectadas alterações na expressão protéica 24 e 30 horas após o tratamento com RI, os resultados do presente estudo demonstram que as células das linhagens MACL-1 e MGSO-3 apresentam certo grau de radiorresistência. Portanto, é válido investigar se existem diferenças na expressão protéica dessas células em relação a células de tecido não tumoral. Com esse objetivo, foram preparados géis 2D-DIGE a partir de amostras de extratos protéicos de células dessas linhagens e de células de tecido de mama saudável.

Após a separação dos extratos protéicos pela técnica de 2D-DIGE, os géis foram analisados e as proteínas de interesse extraídas para posterior identificação por espectrometria de massa. Foram identificadas sete proteínas diferencialmente expressas na linhagem MACL-1 em relação às células obtidas a partir de tecido de mama saudável.

Uma das proteínas com expressão aumentada na linhagem MACL-1 foi a galectina 1, uma lectina envolvida em vários processos celulares. Sabe-se que sua forma monomérica ou dimérica, a localização intracelular ou extracelular, bem como o tipo celular considerado influenciam no efeito induzido por essa proteína (Camby *et al*,

2006). A galectina 1 presente no meio extracelular estimula a mitose em células vasculares (Moiseeva *et al*, 2000) e hepáticas (Maeda *et al*, 2003), mas inibe, por exemplo, o crescimento de células da medula óssea (Andersen *et al*, 2003).

Até o momento, diferentes estudos demonstraram o aumento da expressão de galectina 1 em células de câncer de pulmão (Szoke *et al*, 2007), cólon (Hittelet *et al*, 2003) e bexiga (Sheng *et al*, 2006). Também há aumento da expressão dessa proteína em carcinoma de células basais (Cada *et al*, 2009) e em células da linhagem de câncer mama MDA-MB-231 (Imai *et al*, 2008). Sabe-se que a galectina 1 modifica os processos de adesão e motilidade e a capacidade invasiva de células (Camby *et al*, 2006). Essa proteína promove aumento da adesão de células à matriz extracelular (Van Den Brule *et al*, 2003) e a células endoteliais, favorecendo a dispersão de células tumorais (Glinsky *et al*, 2000). Além disso, a superexpressão de galectina 1 em células de carcinoma hepático resulta em aumento da migração e da capacidade invasiva dessas células (Spano *et al*, 2010).

Por sua vez, a expressão de galectina 1 na membrana de células de carcinoma mamário está relacionada a um fenótipo altamente invasivo (Harvey *et al*, 2001). De fato, no presente estudo, a detecção da superexpressão de galectina 1 nas células da linhagem MACL-1 está de acordo com dados clínicos. Na ocasião do diagnóstico, com base no resultado do exame de microscopia, o tumor da paciente foi descrito como carcinoma ductal invasor (Anexo A). A partir de fragmento desse tumor foram extraídas as células que deram origem à linhagem MACL-1.

Atualmente, a galectina 1 é considerada uma das principais lectinas envolvidas na carcinogênese (Demydenko, Berest, 2009). Sua superexpressão está relacionada ao aumento da capacidade invasiva das células tumorais (Jung *et al*, 2007) bem como à habilidade de escapar da ação do sistema imune por meio da indução de apoptose em células T (He, Baum, 2004). Sendo assim, o aumento da expressão dessa proteína pode ser considerado um fator prognóstico ruim e sua avaliação pode ser empregada como auxiliar no diagnóstico. Além disso, o uso de inibidores de galectina 1 pode ser uma estratégia válida para favorecer o controle do câncer de mama (Demydenko, Berest, 2009).

Ao contrário do que foi demonstrado para a galectina 1, no presente estudo foi detectada redução da expressão de anexina A2 nas células da linhagem MACL-1 quando comparada com células saudáveis. As anexinas são proteínas capazes de se ligar a fosfolípidos de membrana de maneira dependente de Ca^{2+} (Babiychuk, Draeger, 2000). A anexina A2 é um membro dessa família de proteínas que interage com a actina modulando sua polimerização e mantendo a plasticidade do citoesqueleto (Hayes, Thor, 2002). Estudos sugerem que tumores de mama com aumento da expressão de anexina A2 têm prognóstico menos favorável uma vez que essa proteína parece estar envolvida em mecanismos de inibição de apoptose (Chuthapisith *et al*, 2009), de estabelecimento de metástases (Sharma *et al*, 2010) e de resistência à quimioterapia (Zhang *et al*, 2009).

Além disso, em relação à expressão em células de mama saudável, a anexina A2 encontra-se superexpressa na linhagem MDA-MB-231, considerada metastática. Por outro lado, há redução da expressão dessa proteína em diversas linhagens de células de câncer de mama não metastáticas (Imai *et al*, 2008). Entretanto, estudos demonstram que a redução da expressão de anexina A2 está associada ao desenvolvimento e à progressão do câncer de próstata (Liu *et al*, 2003) e nasofaríngeo (Chan *et al*, 2008). Sendo assim, com base no nível de expressão dessa única proteína não é possível definir o potencial metastático e a agressividade das células da linhagem MACL-1.

A expressão de outro membro da família das anexinas, a anexina V, apresentou-se reduzida em células da linhagem MACL-1 em relação a células de mama saudável. Os dados de literatura a respeito da expressão dessa anexina em células tumorais são variáveis. Ocorre aumento da expressão de anexina V em carcinomas de pâncreas (Cui *et al*, 2009) e de esôfago (Du *et al*, 2007). Por sua vez, observou-se redução da expressão de anexina V em câncer de bexiga (Celis *et al*, 2002) e em um estudo realizado em camundongos com tumores pulmonares (Bortner *et al*, 2009). Portanto, o papel dessa anexina no câncer ainda é controverso.

Outra proteína com expressão reduzida nas células MACL-1 em relação às células de tecido de mama saudável foi a calumenina. Essa proteína possui seis domínios

de ligação de Ca^{2+} do tipo mão-EF e está presente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Honore, Vorum, 2000). A redução da expressão de calumenina foi demonstrada em linhagens de células de outras neoplasias como células metastáticas de carcinoma de cabeça e pescoço (Wu *et al*, 2002) e de fígado (Ding *et al*, 2004). Entretanto, o papel da calumenina na carcinogênese ainda não está bem estabelecido.

Nas células da linhagem MGSO-3 foi identificado aumento da expressão de HSP 27, uma proteína de choque térmico de 27 kDa que exerce função protetora contra diferentes tipos de estresse celular como calor (Landry *et al*, 1989) e espécies reativas de oxigênio (Mehlen *et al*, 1997; Rogalla *et al*, 1999). Além disso, a superexpressão dessa proteína está associada à resistência à quimioterapia em pacientes com câncer de ovário (Langdon *et al*, 1995), esôfago (Langer *et al*, 2008) e mama (Vargas-Roig *et al*, 1998). Estudos demonstraram, também, que a superexpressão de HSP 27 em tumores de próstata (Foster *et al*, 2009) e estômago (Giaginis *et al*, 2009) está relacionada a prognóstico desfavorável. Sabe-se que parte do efeito protetor induzido pela HSP 27 é mediado pela redução da liberação de citocromo c (Paul *et al*, 2002) e conseqüente diminuição da ativação de caspase 9 (Garrido *et al*, 1999; Bruey *et al*, 2000). No presente estudo, não foi observada ativação dessa caspase nas células da linhagem MGSO-3 após o tratamento com radiação γ . Esse mesmo tratamento ativou a caspase 9 nas células das linhagens MACL-1 e MDA-MB-231. Pode ser sugerido que a ausência de ativação dessa caspase na linhagem MGSO-3 resulte da expressão elevada de HSP 27 nessas células.

As proteínas com expressão diferencial identificadas no presente estudo estão descritas na literatura de câncer. Entretanto, são necessários mais estudos para definir o papel que desempenham no estabelecimento e na progressão dos tumores. Além disso, sua aplicação como marcadores de diagnóstico e prognóstico não foi claramente estabelecida. Apesar de o número de proteínas identificadas até o momento ter sido reduzido, foi possível estabelecer correlação entre características biológicas das células de câncer de mama humano MACL-1 e MGSO-3 e o nível de expressão das proteínas galectina 1 e HSP 27.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi demonstrado que parte da morte celular induzida pela radiação γ nas células das linhagens de câncer de mama humano, MACL-1 e MGSO-3, é dependente da ativação de caspases. Essas células apresentam certo grau de radiorresistência e seu perfil de expressão protéica difere daquele de células obtidas de tecido de mama saudável tendo sido detectado aumento da expressão de proteínas relacionadas à invasividade e à resistência a diferentes tipos de estresse celular. Tais alterações são compatíveis com características biológicas dessas células.

Esses resultados, associados ao fato de que as linhagens MACL-1 e MGSO-3 foram estabelecidas a partir de tumores primários, podem dar suporte a estudos que empreguem essas células na investigação de mecanismos envolvidos na resistência à radioterapia bem como na identificação de potenciais marcadores de diagnóstico e prognóstico de câncer de mama.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a presença de alterações na expressão protéica de diferentes frações celulares em diferentes momentos após o tratamento com radiação γ ;
- Validar os resultados de alteração da expressão protéica por meio de PCR em tempo real e western blot;
- Comparar o perfil de expressão protéica das linhagens MACL-1 e MGSO-3 com aquele de novas amostras de células de tecido de mama saudável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITZ, M. ; LEYLAND-JONES, B. A systems approach to clinical oncology: focus on breast cancer. **Proteome Sci**, v. 4, n., p. 5. 2006.

ADRAIN, C.; MURPHY, B. M. ; MARTIN, S. J. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, Feb 11, p. 4663-4673. 2005.

ADRIAENSSENS, E.; VANHECKE, E.; SAULE, P.; MOUGEL, A.; PAGE, A.; ROMON, R.; NURCOMBE, V.; LE BOURHIS, X. ; HONDERMARCK, H. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. **Cancer Res**, v. 68, n. 2, Jan 15, p. 346-351. 2008.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (eds). The cell cycle and programmed cell death. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th. ed. New York: Garland Science, 2002. Cap. 17, p. 983-1026.

AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J. ; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, Apr 1, p. 3983-3988. 2003.

AMARAVADI, R. K. ; THOMPSON, C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 24, Dec 15, p. 7271-7279. 2007.

ANDERSEN, H.; JENSEN, O. N. ; ERIKSEN, E. F. A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: identification and characterisation of cyclophilin A. **Eur J Cancer**, v. 39, n. 7, May, p. 989-995. 2003.

ANTHONY, D. A.; ANDREWS, D. M.; WATT, S. V.; TRAPANI, J. A. ; SMYTH, M. J. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. **Immunol Rev**, v. 235, n. 1, May, p. 73-92. 2010.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, Jun, p. 420-430. 2002.

AUBRY, J. P.; BLAECKE, A.; LECOANET-HENCHOZ, S.; JEANNIN, P.; HERBAULT, N.; CARON, G.; MOINE, V. ; BONNEFOY, J. Y. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. **Cytometry**, v. 37, n. 3, Nov 1, p. 197-204. 1999.

BABIYCHUK, E. B. ; DRAEGER, A. Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. **J Cell Biol**, v. 150, n. 5, Sep 4, p. 1113-1124. 2000.

BANKS, R. E.; DUNN, M. J.; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J. C.; BLACKSTOCK, W.; PAPPIN, D. J. ; SELBY, P. J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **Lancet**, v. 356, n. 9243, Nov 18, p. 1749-1756. 2000.

- BELKA, C.; RUDNER, J.; WESSELBORG, S.; STEP CZYNSKA, A.; MARINI, P.; LEPPLE-WIENHUES, A.; FALTIN, H.; BAMBERG, M.; BUDACH, W. ; SCHULZE-OSTHOFF, K. Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 9, Feb 24, p. 1181-1190. 2000.
- BERGONIE J.; TRIBONDEAU L. De quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. **Comptes-Rendus des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 143, p. 983-985. 1906.
- BISH, A.; RAMIREZ, A.; BURGESS, C. ; HUNTER, M. Understanding why women delay in seeking help for breast cancer symptoms. **J Psychosom Res**, v. 58, n. 4, Apr, p. 321-326. 2005.
- BLOCHER, D. DNA double-strand break repair determines the RBE of alpha-particles. **Int J Radiat Biol**, v. 54, n. 5, Nov, p. 761-771. 1988.
- BORTNER, J. D., JR.; DAS, A.; UMSTEAD, T. M.; FREEMAN, W. M.; SOMIARI, R.; ALIAGA, C.; PHELPS, D. S. ; EL-BAYOUMY, K. Down-regulation of 14-3-3 isoforms and annexin A5 proteins in lung adenocarcinoma induced by the tobacco-specific nitrosamine NNK in the A/J mouse revealed by proteomic analysis. **J Proteome Res**, v. 8, n. 8, Aug, p. 4050-4061. 2009.
- BOSSARD, C.; JARRY, A.; COLOMBEIX, C.; BACH-NGOHOU, K.; MOREAU, A.; LOUSSOUARN, D.; MOSNIER, J. F. ; LABOISSE, C. L. Phosphohistone H3 labelling for histoprognostic grading of breast adenocarcinomas and computer-assisted determination of mitotic index. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 7, Jul, p. 706-710. 2006.
- BRUEY, J. M.; DUCASSE, C.; BONNIAUD, P.; RAVAGNAN, L.; SUSIN, S. A.; DIAZ-LATOUD, C.; GURBUXANI, S.; ARRIGO, A. P.; KROEMER, G.; SOLARY, E. ; GARRIDO, C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 9, Sep, p. 645-652. 2000.
- BURDALL, S. E.; HANBY, A. M.; LANSDOWN, M. R. ; SPEIRS, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 2, p. 89-95. 2003.
- CADA, Z.; SMETANA, K., JR.; LACINA, L.; PLZAKOVA, Z.; STORK, J.; KALTNER, H.; RUSSWURM, R.; LENSCH, M.; ANDRE, S. ; GABIUS, H. J. Immunohistochemical fingerprinting of the network of seven adhesion/growth-regulatory lectins in human skin and detection of distinct tumour-associated alterations. **Folia Biol (Praha)**, v. 55, n. 4, p. 145-152. 2009.
- CAILLEAU, R.; YOUNG, R.; OLIVE, M. ; REEVES, W. J., JR. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **J Natl Cancer Inst**, v. 53, n. 3, Sep, p. 661-674. 1974.
- CALCAGNILE, O. ; GISSELSSON, D. Telomere dysfunction and telomerase activation in cancer--a pathological paradox? **Cytogenet Genome Res**, v. 118, n. 2-4, p. 270-276. 2007.

CAMBY, I.; LE MERCIER, M.; LEFRANC, F. ; KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, Nov, p. 137R-157R. 2006.

CANCELLO, G.; MAISONNEUVE, P.; ROTMENSZ, N.; VIALE, G.; MASTROPASQUA, M. G.; PRUNERI, G.; VERONESI, P.; TORRISI, R.; MONTAGNA, E.; LUINI, A.; INTRA, M.; GENTILINI, O.; GHISINI, R.; GOLDHIRSCH, A. ; COLLEONI, M. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. **Ann Oncol**, v., n., Mar 23, p. 2010.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R. ; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, Apr 12, p. 2825-2837. 2004a.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; VALENT, A.; RASLOVA, H.; YAKUSHIJIN, K.; HORNE, D.; FEUNTEUN, J.; LENOIR, G.; MEDEMA, R.; VAINCHENKER, W. ; KROEMER, G. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. **Oncogene**, v. 23, n. 25, May 27, p. 4362-4370. 2004b.

CELIS, J. E.; CELIS, P.; PALSDOTTIR, H.; OSTERGAARD, M.; GROMOV, P.; PRIMDAHL, H.; ORNTOFT, T. F.; WOLF, H.; CELIS, A. ; GROMOVA, I. Proteomic strategies to reveal tumor heterogeneity among urothelial papillomas. **Mol Cell Proteomics**, v. 1, n. 4, Apr, p. 269-279. 2002.

CELIS, J. E.; MOREIRA, J. M.; CABEZON, T.; GROMOV, P.; FRIIS, E.; RANK, F. ; GROMOVA, I. Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 4, Apr, p. 492-522. 2005.

CHADHA, M.; MEHTA, P.; FELDMAN, S.; BOOLBOL, S. K. ; HARRISON, L. B. Intraoperative high-dose-rate brachytherapy--a novel technique in the surgical management of axillary recurrence. **Breast J**, v. 15, n. 2, Mar-Apr, p. 140-145. 2009.

CHAN, C. M.; WONG, S. C.; LAM, M. Y.; HUI, E. P.; CHAN, J. K.; LO, E. S.; CHEUK, W.; WONG, M. C.; TSAO, S. W. ; CHAN, A. T. Proteomic comparison of nasopharyngeal cancer cell lines C666-1 and NP69 identifies down-regulation of annexin II and beta2-tubulin for nasopharyngeal carcinoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 4, Apr, p. 675-683. 2008.

CHANG, B. D.; BROUDE, E. V.; DOKMANOVIC, M.; ZHU, H.; RUTH, A.; XUAN, Y.; KANDEL, E. S.; LAUSCH, E.; CHRISTOV, K. ; RONINSON, I. B. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. **Cancer Res**, v. 59, n. 15, Aug 1, p. 3761-3767. 1999.

CHARGARI, C.; TOILLON, R. A.; MACDERMED, D.; CASTADOT, P. ; MAGNE, N. Concurrent hormone and radiation therapy in patients with breast cancer: what is the rationale? **Lancet Oncol**, v. 10, n. 1, Jan, p. 53-60. 2009.

CHEN, C. J.; KONO, H.; GOLENBOCK, D.; REED, G.; AKIRA, S. ; ROCK, K. L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat Med**, v. 13, n. 7, Jul, p. 851-856. 2007.

CHOI, K. M.; KANG, C. M.; CHO, E. S.; KANG, S. M.; LEE, S. B. ; UM, H. D. Ionizing radiation-induced micronucleus formation is mediated by reactive oxygen species that are produced in a manner dependent on mitochondria, Nox1, and JNK. **Oncol Rep**, v. 17, n. 5, May, p. 1183-1188. 2007.

CHUTHAPISITH, S.; BEAN, B. E.; COWLEY, G.; EREMIN, J. M.; SAMPHAO, S.; LAYFIELD, R.; KERR, I. D.; WISEMAN, J.; EL-SHEEMY, M.; SREENIVASAN, T. ; EREMIN, O. Annexins in human breast cancer: Possible predictors of pathological response to neoadjuvant chemotherapy. **Eur J Cancer**, v. 45, n. 7, May, p. 1274-1281. 2009.

CLARKE, R.; RESSOM, H. W.; WANG, A.; XUAN, J.; LIU, M. C.; GEHAN, E. A. ; WANG, Y. The properties of high-dimensional data spaces: implications for exploring gene and protein expression data. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 1, Jan, p. 37-49. 2008.

COBLEIGH, M. A.; VOGEL, C. L.; TRIPATHY, D.; ROBERT, N. J.; SCHOLL, S.; FEHRENBACHER, L.; WOLTER, J. M.; PATON, V.; SHAK, S.; LIEBERMAN, G. ; SLAMON, D. J. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 9, Sep, p. 2639-2648. 1999.

CONCIN, N.; ZEILLINGER, C.; STIMPFEL, M.; SCHIEBEL, I.; TONG, D.; WOLFF, U.; REINER, A.; LEODOLTER, S. ; ZEILLINGER, R. p53-dependent radioresistance in ovarian carcinoma cell lines. **Cancer Lett**, v. 150, n. 2, Mar 31, p. 191-199. 2000.

CORCELLE, E.; NEBOUT, M.; BEKRI, S.; GAUTHIER, N.; HOFMAN, P.; POUJEOL, P.; FENICHEL, P. ; MOGRABI, B. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. **Cancer Res**, v. 66, n. 13, Jul 1, p. 6861-6870. 2006.

CORREA, C. R.; BERTOLLO, C. M. ; GOES, A. M. Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. **Oncol Res**, v. 17, n. 10, p. 473-482. 2009.

COUCKE, P. A. ; CROMPTON, N. E. Molecular basis of radioresistance. **Eur J Cancer**, v. 31A, n. 5, p. 844-846. 1995.

COX, M. C.; DAN, T. D. ; SWAIN, S. M. Emerging drugs to replace current leaders in first-line therapy for breast cancer. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 11, n. 3, Sep, p. 489-501. 2006.

CREAGH, E. M.; CONROY, H. ; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev**, v. 193, n., Jun, p. 10-21. 2003.

CRUGLIANO, T.; QUARESIMA, B.; GASPARI, M.; FANIELLO, M. C.; ROMEO, F.; BAUDI, F.; CUDA, G.; COSTANZO, F.; VENUTA, S. Specific changes in the proteomic pattern produced by the BRCA1-Ser1841Asn missense mutation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 220-226. 2007.

CUI, Y.; ZHANG, D.; JIA, Q.; LI, T.; ZHANG, W.; HAN, J. Proteomic and tissue array profiling identifies elevated hypoxia-regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Invest**, v. 27, n. 7, Aug, p. 747-755. 2009.

DALBY, K. N.; TEKEDERELI, I.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; OZPOLAT, B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, v. 6, n. 3, Apr, p. 322-329. 2010.

DAWOOD, S.; BROGLIO, K.; ESTEVA, F. J.; IBRAHIM, N. K.; KAU, S. W.; ISLAM, R.; ALDAPE, K. D.; YU, T. K.; HORTOBAGYI, G. N.; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. **Ann Oncol**, v., n., Mar 11, p. 2008.

DE BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 8, Dec, p. 737-749. 2008.

DE LANGE, T. Telomere-related genome instability in cancer. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 70, n., p. 197-204. 2005.

DEJEUX, E.; RONNEBERG, J. A.; SOLVANG, H.; BUKHOLM, I.; GEISLER, S.; AAS, T.; GUT, I. G.; BORRESEN-DALE, A. L.; LONNING, P. E.; KRISTENSEN, V. N.; TOST, J. DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. **Mol Cancer**, v. 9, n., p. 68. 2010.

DEMYDENKO, D.; BEREST, I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. **Exp Oncol**, v. 31, n. 2, Jun, p. 74-79. 2009.

DEWAR, J. A. Postmastectomy radiotherapy. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 18, n. 3, Apr, p. 185-190. 2006.

DI PIETRO, C.; RAGUSA, M.; BARBAGALLO, D.; DURO, L. R.; GUGLIELMINO, M. R.; MAJORANA, A.; ANGELICA, R.; SCALIA, M.; STATELLO, L.; SALITO, L.; TOMASELLO, L.; PERNAGALLO, S.; VALENTI, S.; D'AGOSTINO, V.; TRIBERIO, P.; TANDURELLA, I.; PALUMBO, G. A.; LA CAVA, P.; CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; LI DESTRI, G.; LANZAFAME, S.; DI RAIMONDO, F.; STEFANI, S.; MISHRA, B.; PURRELLO, M. The apoptotic machinery as a biological complex system: analysis of its omics and evolution, identification of candidate genes for fourteen major types of cancer, and experimental validation in CML and neuroblastoma. **BMC Med Genomics**, v. 2, n., p. 20. 2009.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; ET AL. A

biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 20, Sep 26, p. 9363-9367. 1995.

DING, S. J.; LI, Y.; SHAO, X. X.; ZHOU, H.; ZENG, R.; TANG, Z. Y. ; XIA, Q. C. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. **Proteomics**, v. 4, n. 4, Apr, p. 982-994. 2004.

DING, Z. B.; SHI, Y. H.; ZHOU, J.; QIU, S. J.; XU, Y.; DAI, Z.; SHI, G. M.; WANG, X. Y.; KE, A. W.; WU, B. ; FAN, J. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v. 68, n. 22, Nov 15, p. 9167-9175. 2008.

DOGU, Y. ; DIAZ, J. Mathematical model of a network of interaction between p53 and Bcl-2 during genotoxic-induced apoptosis. **Biophys Chem**, v. 143, n. 1-2, Jul, p. 44-54. 2009.

DU BOIS, A.; REUSS, A.; PUJADE-LAURINE, E.; HARTER, P.; RAY-COQUARD, I. ; PFISTERER, J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). **Cancer**, v. 115, n. 6, Mar 15, p. 1234-1244. 2009.

DU, X. L.; HU, H.; LIN, D. C.; XIA, S. H.; SHEN, X. M.; ZHANG, Y.; LUO, M. L.; FENG, Y. B.; CAI, Y.; XU, X.; HAN, Y. L.; ZHAN, Q. M. ; WANG, M. R. Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. **J Mol Med**, v. 85, n. 8, Aug, p. 863-875. 2007.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A. ; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, n. 6662, Jan 1, p. 43-50. 1998.

ERIKSSON, D.; LOFROTH, P. O.; JOHANSSON, L.; RIKLUND, K. A. ; STIGBRAND, T. Cell cycle disturbances and mitotic catastrophes in HeLa Hep2 cells following 2.5 to 10 Gy of ionizing radiation. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 18 Pt 2, Sep 15, p. 5501s-5508s. 2007.

ERNST, A.; OKKELS, H.; GROVE, A.; SVARRER, T.; KNUDSEN, A.; MADSEN, P. H. ; KRARUP, H. B. Telomerase activity determined by conventional telomeric repeat amplification protocol and reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in ovarian lesions: a comparison of assays. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 66, n. 4, p. 287-297. 2006.

ESPINOSA, E.; REDONDO, A.; VARA, J. A.; ZAMORA, P.; CASADO, E.; CEJAS, P. ; BARON, M. G. High-throughput techniques in breast cancer: a clinical perspective. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 5, Mar, p. 598-607. 2006.

ESTIMATIVA 2010: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol**, v. 148, n. 7, Apr 1, p. 2207-2216. 1992.

FAYANJU, O. M.; RITTER, J.; GILLANDERS, W. E.; EBERLEIN, T. J.; DIETZ, J. R.; AFT, R.; MARGENTHALER, J. A. Therapeutic management of intracystic papillary carcinoma of the breast: the roles of radiation and endocrine therapy. **Am J Surg**, v. 194, n. 4, Oct, p. 497-500. 2007.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 9-10, Sep-Oct, p. 1371-1387. 2006.

FOSTER, C. S.; DODSON, A. R.; AMBROISINE, L.; FISHER, G.; MOLLER, H.; CLARK, J.; ATTARD, G.; DE-BONO, J.; SCARDINO, P.; REUTER, V. E.; COOPER, C. S.; BERNEY, D. M.; CUZICK, J. Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. **Br J Cancer**, v. 101, n. 7, Oct 6, p. 1137-1144. 2009.

FRANK, S.; GAUME, B.; BERGMANN-LEITNER, E. S.; LEITNER, W. W.; ROBERT, E. G.; CATEZ, F.; SMITH, C. L.; YOULE, R. J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. **Dev Cell**, v. 1, n. 4, Oct, p. 515-525. 2001.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319. 2006.

GAHR, S.; PETER, G.; WISSNIOWSKI, T. T.; HAHN, E. G.; HEROLD, C.; OCKER, M. The histone-deacetylase inhibitor MS-275 and the CDK-inhibitor CYC-202 promote anti-tumor effects in hepatoma cell lines. **Oncol Rep**, v. 20, n. 5, Nov, p. 1249-1256. 2008.

GALLUCCI, S.; LOLKEMA, M.; MATZINGER, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. **Nat Med**, v. 5, n. 11, Nov, p. 1249-1255. 1999.

GARRIDO, C.; BRUEY, J. M.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A.; ARRIGO, A. P.; SOLARY, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **FASEB J**, v. 13, n. 14, Nov, p. 2061-2070. 1999.

GAST, M. C.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. Clinical proteomics in breast cancer: a review. **Breast Cancer Res Treat**, v. 116, n. 1, Jul, p. 17-29. 2009.

GEWIRTZ, D. A.; HOLT, S. E.; ELMORE, L. W. Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 8, Oct 15, p. 947-957. 2008.

GIAGINIS, C.; DASKALOPOULOU, S. S.; VGENOPOULOU, S.; SFINIADAKIS, I.; KOURAKLIS, G. ; THEOCHARIS, S. E. Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival. **BMC Gastroenterol**, v. 9, n., p. 14. 2009.

GIAGKOUSIKLIDIS, S.; VOGLER, M.; WESTHOFF, M. A.; KASPERCZYK, H.; DEBATIN, K. M. ; FULDA, S. Sensitization for gamma-irradiation-induced apoptosis by second mitochondria-derived activator of caspase. **Cancer Res**, v. 65, n. 22, Nov 15, p. 10502-10513. 2005.

GIL, J.; STEMBALSKA, A.; PESZ, K. A. ; SASIADEK, M. M. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. **J Appl Genet**, v. 49, n. 2, p. 193-199. 2008.

GJERDRUM, C.; TIRON, C.; HOIBY, T.; STEFANSSON, I.; HAUGEN, H.; SANDAL, T.; COLLETT, K.; LI, S.; MCCORMACK, E.; GJERTSEN, B. T.; MICKLEM, D. R.; AKSLEN, L. A.; GLACKIN, C. ; LORENS, J. B. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 3, Jan 19, p. 1124-1129. 2010.

GLINSKY, V. V.; HUFLEJT, M. E.; GLINSKY, G. V.; DEUTSCHER, S. L. ; QUINN, T. P. Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. **Cancer Res**, v. 60, n. 10, May 15, p. 2584-2588. 2000.

GOLSTEIN, P. ; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, Jan, p. 37-43. 2007.

GOODACRE, R. Metabolomics – the way forward. Metabolomics, v.1, n.1, Jan, p.1-2. 2005.

GOW, M. D.; SEYMOUR, C. B.; BYUN, S. H. ; MOTHERSILL, C. E. Effect of dose rate on the radiation-induced bystander response. **Phys Med Biol**, v. 53, n. 1, Jan 7, p. 119-132. 2008.

GU, Y.; WANG, C. ; COHEN, A. Effect of IGF-1 on the balance between autophagy of dysfunctional mitochondria and apoptosis. **FEBS Lett**, v. 577, n. 3, Nov 19, p. 357-360. 2004.

GULSTON, M.; DE LARA, C.; JENNER, T.; DAVIS, E. ; O'NEILL, P. Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 4, p. 1602-1609. 2004.

GUPTA, G. P.; NGUYEN, D. X.; CHIANG, A. C.; BOS, P. D.; KIM, J. Y.; NADAL, C.; GOMIS, R. R.; MANOVA-TODOROVA, K. ; MASSAGUE, J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. **Nature**, v. 446, n. 7137, Apr 12, p. 765-770. 2007.

- GUPTA, P. B.; MANI, S.; YANG, J.; HARTWELL, K. ; WEINBERG, R. A. The evolving portrait of cancer metastasis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 70, n., p. 291-297. 2005.
- HAHN, W. C.; COUNTER, C. M.; LUNDBERG, A. S.; BEIJERSBERGEN, R. L.; BROOKS, M. W. ; WEINBERG, R. A. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. **Nature**, v. 400, n. 6743, Jul 29, p. 464-468. 1999.
- HANAHAH, D. ; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, Jan 7, p. 57-70. 2000.
- HANASH, S. Disease proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, Mar 13, p. 226-232. 2003.
- HARBECK, N. ; HAIDINGER, R. The patient experience. **Breast Cancer Res Treat**, v. 105 Suppl 1, n., p. 91-103. 2007.
- HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B. ; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, May 31, p. 458-460. 1990.
- HARPER, L. J.; COSTEA, D. E.; GAMMON, L.; FAZIL, B.; BIDDLE, A. ; MACKENZIE, I. C. Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. **BMC Cancer**, v. 10, n., p. 166. 2010.
- HARVEY, S.; ZHANG, Y.; LANDRY, F.; MILLER, C. ; SMITH, J. W. Insights into a plasma membrane signature. **Physiol Genomics**, v. 5, n. 3, Apr 2, p. 129-136. 2001.
- HATAKE, K.; TOKUDOME, N. ; ITO, Y. Next generation molecular targeted agents for breast cancer: focus on EGFR and VEGFR pathways. **Breast Cancer**, v. 14, n. 2, p. 132-149. 2007.
- HATHOUT, Y.; GEHRMANN, M. L.; CHERTOV, A. ; FENSELAU, C. Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer. **Cancer Lett**, v. 210, n. 2, Jul 16, p. 245-253. 2004.
- HAYASHI, K.; MOTOYAMA, S.; KOYOTA, S.; KOIZUMI, Y.; WANG, J.; TAKASAWA, S.; ITAYA-HIRONAKA, A.; SAKURAMOTO-TSUCHIDA, S.; MARUYAMA, K.; SAITO, H.; MINAMIYA, Y.; OGAWA, J. ; SUGIYAMA, T. REG I enhances chemo- and radiosensitivity in squamous cell esophageal cancer cells. **Cancer Sci**, v. 99, n. 12, Dec, p. 2491-2495. 2008.
- HAYES, D. F. ; THOR, A. D. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. **Semin Oncol**, v. 29, n. 3, Jun, p. 231-245. 2002.
- HAYFLICK, L. ; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, v. 25, n., Dec, p. 585-621. 1961.
- HE, J. ; BAUM, L. G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, Feb 6, p. 4705-4712. 2004.

HENDZEL, M. J.; WEI, Y.; MANCINI, M. A.; VAN HOOSER, A.; RANALLI, T.; BRINKLEY, B. R.; BAZETT-JONES, D. P. ; ALLIS, C. D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, n. 6, Nov, p. 348-360. 1997.

HITTELET, A.; LEGENDRE, H.; NAGY, N.; BRONCKART, Y.; PECTOR, J. C.; SALMON, I.; YEATON, P.; GABIUS, H. J.; KISS, R. ; CAMBY, I. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. **Int J Cancer**, v. 103, n. 3, Jan 20, p. 370-379. 2003.

HOLLER, N.; ZARU, R.; MICHEAU, O.; THOME, M.; ATTINGER, A.; VALITUTTI, S.; BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; SEED, B. ; TSCHOPP, J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nat Immunol**, v. 1, n. 6, Dec, p. 489-495. 2000.

HONORE, B. ; VORUM, H. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. **FEBS Lett**, v. 466, n. 1, Jan 21, p. 11-18. 2000.

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J. ; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc Revasc Med**, v. 7, n. 3, Jul-Sep, p. 165-172. 2006.

HOYER-HANSEN, M.; BASTHOLM, L.; SZYNIAROWSKI, P.; CAMPANELLA, M.; SZABADKAI, G.; FARKAS, T.; BIANCHI, K.; FEHRENBACHER, N.; ELLING, F.; RIZZUTO, R.; MATHIASSEN, I. S. ; JAATTELA, M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. **Mol Cell**, v. 25, n. 2, Jan 26, p. 193-205. 2007.

IBRAHIM, N. K.; DESAI, N.; LEGHA, S.; SOON-SHIONG, P.; THERIAULT, R. L.; RIVERA, E.; ESMAELI, B.; RING, S. E.; BEDIKIAN, A.; HORTOBAGYI, G. N. ; ELLERHORST, J. A. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 5, May, p. 1038-1044. 2002.

IMAI, K.; ICHIBANGASE, T.; SAITOH, R. ; HOSHIKAWA, Y. A proteomics study on human breast cancer cell lines by fluorogenic derivatization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**, v. 22, n. 11, Nov, p. 1304-1314. 2008.

INCE, T. A.; RICHARDSON, A. L.; BELL, G. W.; SAITOH, M.; GODAR, S.; KARNOUB, A. E.; IGLEHART, J. D. ; WEINBERG, R. A. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. **Cancer Cell**, v. 12, n. 2, Aug, p. 160-170. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Controle do câncer de mama. Documento de consenso. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

IWATA, J.; EZAKI, J.; KOMATSU, M.; YOKOTA, S.; UENO, T.; TANIDA, I.; CHIBA, T.; TANAKA, K. ; KOMINAMI, E. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. **J Biol Chem**, v. 281, n. 7, Feb 17, p. 4035-4041. 2006.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T. ; THUN, M. J. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin**, v. 58, n. 2, Mar-Apr, p. 71-96. 2008.

JIAO, Y.; WANG, H. C. ; FAN, S. J. Growth suppression and radiosensitivity increase by HMGB1 in breast cancer. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 12, Dec, p. 1957-1967. 2007.

JIN, C.; BAI, L. ; GUO, G. Radiosensitization by the combination of SR-2508 and paclitaxel in hypoxic human tumor cells in vitro. **J Radiat Res (Tokyo)**, v. 48, n. 3, May, p. 179-185. 2007.

JOHNSON, J. P. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. **Cancer Metastasis Rev**, v. 10, n. 1, May, p. 11-22. 1991.

JONES, D. T.; GANESHAGURU, K.; VIRCHIS, A. E.; FOLARIN, N. I.; LOWDELL, M. W.; MEHTA, A. B.; PRENTICE, H. G.; HOFFBRAND, A. V. ; WICKREMASINGHE, R. G. Caspase 8 activation independent of Fas (CD95/APO-1) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation. **Blood**, v. 98, n. 9, Nov 1, p. 2800-2807. 2001.

JUNG, E. J.; MOON, H. G.; CHO, B. I.; JEONG, C. Y.; JOO, Y. T.; LEE, Y. J.; HONG, S. C.; CHOI, S. K.; HA, W. S.; KIM, J. W.; LEE, C. W.; LEE, J. S. ; PARK, S. T. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. **Int J Cancer**, v. 120, n. 11, Jun 1, p. 2331-2338. 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. Cap. 22, p. 431-451.

KAO, G. D.; MCKENNA, W. G. ; YEN, T. J. Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. **Oncogene**, v. 20, n. 27, Jun 14, p. 3486-3496. 2001.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, Aug, p. 239-257. 1972.

KIM, J. Y.; KIM, C. H.; STRATFORD, I. J.; PATTERSON, A. V. ; HENDRY, J. H. The bioreductive agent RH1 and gamma-irradiation both cause G2/M cell cycle phase arrest and polyploidy in a p53-mutated human breast cancer cell line. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 58, n. 2, Feb 1, p. 376-385. 2004.

KONERI, K.; GOI, T.; HIRONO, Y.; KATAYAMA, K. ; YAMAGUCHI, A. Beclin 1 gene inhibits tumor growth in colon cancer cell lines. **Anticancer Res**, v. 27, n. 3B, May-Jun, p. 1453-1457. 2007.

KRAUS-TIEFENBACHER, U.; BAUER, L.; SCHEDA, A.; SCHOEBER, C.; SCHAEFER, J.; STEIL, V. ; WENZ, F. Intraoperative radiotherapy (IORT) is an option for patients with localized breast recurrences after previous external-beam radiotherapy. **BMC Cancer**, v. 7, n., p. 178. 2007.

KRONTIRIS, T. G. ; COOPER, G. M. Transforming activity of human tumor DNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 2, Feb, p. 1181-1184. 1981.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (eds). Adaptação, dano e morte celular. In: Bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 1, p. 3-48.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (eds). Neoplasia. In: Bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 7, p. 281-356.

KYPRIANOU, N.; KING, E. D.; BRADBURY, D. ; RHEE, J. G. bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. **Int J Cancer**, v. 70, n. 3, Jan 27, p. 341-348. 1997.

LACROIX, M. ; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Res Treat**, v. 83, n. 3, Feb, p. 249-289. 2004.

LANDRY, J.; CHRETIEN, P.; LAMBERT, H.; HICKEY, E. ; WEBER, L. A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. **J Cell Biol**, v. 109, n. 1, Jul, p. 7-15. 1989.

LANE, J. D.; LUCOCQ, J.; PRYDE, J.; BARR, F. A.; WOODMAN, P. G.; ALLAN, V. J. ; LOWE, M. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. **J Cell Biol**, v. 156, n. 3, Feb 4, p. 495-509. 2002.

LANGDON, S. P.; RABIASZ, G. J.; HIRST, G. L.; KING, R. J.; HAWKINS, R. A.; SMYTH, J. F. ; MILLER, W. R. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, v. 1, n. 12, Dec, p. 1603-1609. 1995.

LANGER, R.; OTT, K.; SPECHT, K.; BECKER, K.; LORDICK, F.; BURIAN, M.; HERRMANN, K.; SCHRATTENHOLZ, A.; CAHILL, M. A.; SCHWAIGER, M.; HOFER, H. ; WESTER, H. J. Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 24, Dec 15, p. 8279-8287. 2008.

LAZZARO, F.; GIANNATTASIO, M.; PUDDU, F.; GRANATA, M.; PELLICCIOLI, A.; PLEVANI, P. ; MUZI-FALCONI, M. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 9, Sep 2, p. 1055-1067. 2009.

- LECOEUR, H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. **Exp Cell Res**, v. 277, n. 1, Jul 1, p. 1-14. 2002.
- LEE, J. H.; KOH, Y. A.; CHO, C. K.; LEE, S. J.; LEE, Y. S. ; BAE, S. Identification of a novel ionizing radiation-induced nuclease, AEN, and its functional characterization in apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 337, n. 1, Nov 11, p. 39-47. 2005.
- LEMANSKI, C.; AZRIA, D.; GOURGON-BOURGADE, S.; GUTOWSKI, M.; ROUANET, P.; SAINT-AUBERT, B.; AILLERES, N.; FENOGLIETTO, P. ; DUBOIS, J. B. Intraoperative Radiotherapy in Early-Stage Breast Cancer: Results of the Montpellier Phase II Trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 76, n. 3, Mar 1, p. 698-703. 2009.
- LEVINE, B. Cell biology: autophagy and cancer. **Nature**, v. 446, n. 7137, Apr 12, p. 745-747. 2007.
- LEWIS, J. D.; CHAGPAR, A. B.; SHAUGHNESSY, E. A.; NURKO, J.; MCMASTERS, K. ; EDWARDS, M. J. Excellent outcomes with adjuvant toremifene or tamoxifen in early stage breast cancer. **Cancer**, v. 116, n. 10, May 15, p. 2307-2315. 2010.
- LI, C.; HEIDT, D. G.; DALERBA, P.; BURANT, C. F.; ZHANG, L.; ADSAY, V.; WICHA, M.; CLARKE, M. F. ; SIMEONE, D. M. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Res**, v. 67, n. 3, Feb 1, p. 1030-1037. 2007.
- LIN, H. K.; CHEN, Z.; WANG, G.; NARDELLA, C.; LEE, S. W.; CHAN, C. H.; YANG, W. L.; WANG, J.; EGIA, A.; NAKAYAMA, K. I.; CORDON-CARDO, C.; TERUYA-FELDSTEIN, J. ; PANDOLFI, P. P. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. **Nature**, v. 464, n. 7287, Mar 18, p. 374-379. 2010.
- LIN, Y.; CHOKSI, S.; SHEN, H. M.; YANG, Q. F.; HUR, G. M.; KIM, Y. S.; TRAN, J. H.; NEDOSPASOV, S. A. ; LIU, Z. G. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, Mar 12, p. 10822-10828. 2004.
- LIU, J. W.; SHEN, J. J.; TANZILLO-SWARTS, A.; BHATIA, B.; MALDONADO, C. M.; PERSON, M. D.; LAU, S. S. ; TANG, D. G. Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. **Oncogene**, v. 22, n. 10, Mar 13, p. 1475-1485. 2003.
- LIU, X.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C. ; WANG, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**, v. 89, n. 2, Apr 18, p. 175-184. 1997.
- LOCK, R. B. ; STRIBINSKIENE, L. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. **Cancer Res**, v. 56, n. 17, Sep 1, p. 4006-4012. 1996.
- LODISH, H.; ARNOLD, B.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; MATSUDAIRA, P. (eds). Regulating the eukaryotic

cell cycle. In: Molecular cell biology. 6th. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2008. Cap. 20, p. 847-904.

LUINI, A.; GATTI, G.; GALIMBERTI, V.; ZURRIDA, S.; INTRA, M.; GENTILINI, O.; PAGANELLI, G.; VIALE, G.; ORECCHIA, R.; VERONESI, P. ; VERONESI, U. Conservative treatment of breast cancer: its evolution. **Breast Cancer Res Treat**, v. 94, n. 3, Dec, p. 195-198. 2005.

LUM, J. J.; BAUER, D. E.; KONG, M.; HARRIS, M. H.; LI, C.; LINDSTEN, T. ; THOMPSON, C. B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, v. 120, n. 2, Jan 28, p. 237-248. 2005.

LYNCH, H. T.; SILVA, E.; SNYDER, C. ; LYNCH, J. F. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. **Breast J**, v. 14, n. 1, Jan-Feb, p. 3-13. 2008.

MACHIDA, H.; NAKAJIMA, S.; SHIKANO, N.; NISHIO, J.; OKADA, S.; ASAYAMA, M.; SHIRAI, M. ; KUBOTA, N. Heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiates the radiation response of tumor cells grown as monolayer cultures and spheroids by inducing apoptosis. **Cancer Sci**, v. 96, n. 12, Dec, p. 911-917. 2005.

MAEDA, N.; KAWADA, N.; SEKI, S.; ARAKAWA, T.; IKEDA, K.; IWAO, H.; OKUYAMA, H.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. ; YOSHIZATO, K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, May 23, p. 18938-18944. 2003.

MANSILLA, S.; PRIEBE, W. ; PORTUGAL, J. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Cell Cycle**, v. 5, n. 1, Jan, p. 53-60. 2006.

MASSARI, L. P.; KASTELAN, M. ; GRUBER, F. Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. **Coll Antropol**, v. 31 Suppl 1, n., Jan, p. 83-85. 2007.

MASSON, D. ; TSCHOPP, J. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. **J Biol Chem**, v. 260, n. 16, Aug 5, p. 9069-9072. 1985.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, Apr 12, p. 301-305. 2002.

MCNEILL-BLUE, C.; WETMORE, B. A.; SANCHEZ, J. F.; FREED, W. J. ; MERRICK, B. A. Apoptosis mediated by p53 in rat neural AF5 cells following treatment with hydrogen peroxide and staurosporine. **Brain Res**, v. 1112, n. 1, Sep 27, p. 1-15. 2006.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M. ; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, n. 7261, Sep 9, p. 624-628. 2000.

MEHLEN, P.; HICKEY, E.; WEBER, L. A. ; ARRIGO, A. P. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 241, n. 1, Dec 8, p. 187-192. 1997.

MINN, A. J.; GUPTA, G. P.; PADUA, D.; BOS, P.; NGUYEN, D. X.; NUYTEN, D.; KREIKE, B.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ISHWARAN, H.; FOEKENS, J. A.; VAN DE VIJVER, M. ; MASSAGUE, J. Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 16, Apr 17, p. 6740-6745. 2007.

MIRACCO, C.; COSCI, E.; OLIVERI, G.; LUZI, P.; PACENTI, L.; MONCIATTI, I.; MANNUCCI, S.; DE NISI, M. C.; TOSCANO, M.; MALAGNINO, V.; FALZARANO, S. M.; PIRTOLI, L. ; TOSI, P. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. **Int J Oncol**, v. 30, n. 2, Feb, p. 429-436. 2007.

MOISEEVA, E. P.; JAVED, Q.; SPRING, E. L. ; DE BONO, D. P. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 2, Jan 14, p. 493-502. 2000.

MOREIRA, J. M.; OHLSSON, G.; RANK, F. E. ; CELIS, J. E. Down-regulation of the tumor suppressor protein 14-3-3sigma is a sporadic event in cancer of the breast. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 4, Apr, p. 555-569. 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, Dec 16, p. 55-63. 1983.

MOZDARANI, H.; NASIRIAN, B. ; HAERI, S. A. In vivo gamma-rays induced initial DNA damage and the effect of famotidine in mouse leukocytes as assayed by the alkaline comet assay. **J Radiat Res (Tokyo)**, v. 48, n. 2, Mar, p. 129-134. 2007.

MULLIGHAN, C. G.; PHILLIPS, L. A.; SU, X.; MA, J.; MILLER, C. B.; SHURTLEFF, S. A. ; DOWNING, J. R. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. **Science**, v. 322, n. 5906, Nov 28, p. 1377-1380. 2008.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CUELLO-CARRION, F. D. ; CIOCCA, D. R. Deoxyribonucleic acid damage induced by doxorubicin in peripheral blood mononuclear cells: possible roles for the stress response and the deoxyribonucleic acid repair process. **Cell Stress Chaperones**, v. 8, n. 4, Winter, p. 361-372. 2003.

NARAYANAN, S. ; TAYLOR, I. Adjuvant systemic therapy for operable breast cancer. **Surgeon**, v. 5, n. 2, Apr, p. 101-106; quiz 106, 121. 2007.

NARITA, M. ; LOWE, S. W. Senescence comes of age. **Nat Med**, v. 11, n. 9, Sep, p. 920-922. 2005.

NGUYEN, P. L.; CHEN, M. H.; CATALONA, W. J.; ALEXANDER, B. M.; ROEHL, K. A.; LOEB, S. ; D'AMICO, A. V. Biochemical recurrence after radical prostatectomy for prevalent versus incident cases of prostate cancer : implications for management. **Cancer**, v. 113, n. 11, Dec 1, p. 3146-3152. 2008.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 11, Nov, p. 1028-1042. 1999.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F. ; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, Jun 3, p. 271-279. 1991.

NOWELL, P. C. ; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J Natl Cancer Inst**, v. 25, n., Jul, p. 85-109. 1960.

OHTANI, N.; MANN, D. J. ; HARA, E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. **Cancer Sci**, v. 100, n. 5, May, p. 792-797. 2009.

OKADA, H. ; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, Aug, p. 592-603. 2004.

OPPENHEIM, J. J. ; YANG, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, Aug, p. 359-365. 2005.

PAUL, C.; MANERO, F.; GONIN, S.; KRETZ-REMY, C.; VIROT, S. ; ARRIGO, A. P. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 3, Feb, p. 816-834. 2002.

PODACK, E. R.; YOUNG, J. D. ; COHN, Z. A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 24, Dec, p. 8629-8633. 1985.

PRINCE, M. E.; SIVANANDAN, R.; KACZOROWSKI, A.; WOLF, G. T.; KAPLAN, M. J.; DALERBA, P.; WEISSMAN, I. L.; CLARKE, M. F. ; AILLES, L. E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 3, Jan 16, p. 973-978. 2007.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; ALBANESE, N. N.; DI CARA, G.; MARABETI, M. R.; MARRAZZO, A. ; MINAFRA, S. New Protein Clustering of Breast Cancer Tissue Proteomics Using Actin Content as a Cellularity Indicator. **J Proteome Res**, v., n., Feb 20, p. 2008.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A. M. ; MINAFRA, S. Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. **Proteomics**, v. 6, n. 8, Apr, p. 2609-2625. 2006.

RAFFOUL, J. J.; WANG, Y.; KUCUK, O.; FORMAN, J. D.; SARKAR, F. H. ; HILLMAN, G. G. Genistein inhibits radiation-induced activation of NF-kappaB in

prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest. **BMC Cancer**, v. 6, n., p. 107. 2006.

RAMAKRISHNAN, G.; LO MUZIO, L.; ELINOS-BAEZ, C. M.; JAGAN, S.; AUGUSTINE, T. A.; KAMARAJ, S.; ANANDAKUMAR, P. ; DEVAKI, T. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. **Cell Prolif**, v. 42, n. 2, Apr, p. 229-240. 2009.

RIES, L. A. G.; MELBERT, D.; KRAPCHO, M.; MARIOTTO, A.; MILLER, B. A.; FEUER, E. J.; CLEGG, L.; HORNER, M. J.; HOWLADER, N.; EISNER, M. P.; REICHMAN, M.; EDWARDS, B. K. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2007. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/>, baseado em dados submetidos ao SEER em novembro de 2006.

ROBERTSON, A. M.; BIRD, C. C.; WADDELL, A. W. ; CURRIE, A. R. Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. **J Pathol**, v. 126, n. 3, Nov, p. 181-187. 1978.

RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; LEITE, M. F.; GRANT, W.; ZHANG, L.; LAM, W.; CHENG, Y. C.; BENNETT, A. M. ; NATHANSON, M. H. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 23, Jun 8, p. 17061-17068. 2007.

ROGALLA, T.; EHRNSPERGER, M.; PREVILLE, X.; KOTLYAROV, A.; LUTSCH, G.; DUCASSE, C.; PAUL, C.; WIESKE, M.; ARRIGO, A. P.; BUCHNER, J. ; GAESTEL, M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 274, n. 27, Jul 2, p. 18947-18956. 1999.

RONINSON, I. B.; BROUDE, E. V. ; CHANG, B. D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resist Updat**, v. 4, n. 5, Oct, p. 303-313. 2001.

RUTH, A. C. ; RONINSON, I. B. Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. **Cancer Res**, v. 60, n. 10, May 15, p. 2576-2578. 2000.

SAVILL, J. ; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, n. 6805, Oct 12, p. 784-788. 2000.

SAWAKI, M.; ITO, Y.; AKIYAMA, F.; TOKUDOME, N.; HORII, R.; MIZUNUMA, N.; TAKAHASHI, S.; HORIKOSHI, N.; IMAI, T.; NAKAO, A.; KASUMI, F.; SAKAMOTO, G. ; HATAKE, K. High prevalence of HER-2/neu and p53 overexpression in inflammatory breast cancer. **Breast Cancer**, v. 13, n. 2, p. 172-178. 2006.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T. ; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, n. 6894, Jul 11, p. 191-195. 2002.

SCHERZ-SHOVAL, R.; SHVETS, E.; FASS, E.; SHORER, H.; GIL, L. ; ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, v. 26, n. 7, Apr 4, p. 1749-1760. 2007.

SCHMIDBERGER, H.; HERMANN, R. M.; HESS, C. F. ; EMONS, G. Interactions between radiation and endocrine therapy in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 10, n. 3, Sep, p. 375-388. 2003.

SCHOIER, J.; OLLINGER, K.; KVARNSTROM, M.; SODERLUND, G. ; KIHLLSTROM, E. Chlamydia trachomatis-induced apoptosis occurs in uninfected McCoy cells late in the developmental cycle and is regulated by the intracellular redox state. **Microb Pathog**, v. 31, n. 4, Oct, p. 173-184. 2001.

SEIDMAN, A. D.; BERRY, D.; CIRINCIONE, C.; HARRIS, L.; MUSS, H.; MARCOM, P. K.; GIPSON, G.; BURSTEIN, H.; LAKE, D.; SHAPIRO, C. L.; UNGARO, P.; NORTON, L.; WINER, E. ; HUDIS, C. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 10, Apr 1, p. 1642-1649. 2008.

SEIDMAN, A. D.; TIERSTEN, A.; HUDIS, C.; GOLLUB, M.; BARRETT, S.; YAO, T. J.; LEPORE, J.; GILEWSKI, T.; CURRIE, V.; CROWN, J. ; ET AL. Phase II trial of paclitaxel by 3-hour infusion as initial and salvage chemotherapy for metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 13, n. 10, Oct, p. 2575-2581. 1995.

SHARMA, M.; OWNBEY, R. T. ; SHARMA, M. C. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 2, Apr, p. 278-286. 2010.

SHENG, K. H.; YAO, Y. C.; CHUANG, S. S.; WU, H. ; WU, T. F. Search for the tumor-related proteins of transition cell carcinoma in Taiwan by proteomic analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 3, Feb, p. 1058-1065. 2006.

SHI, Y.; EVANS, J. E. ; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature**, v. 425, n. 6957, Oct 2, p. 516-521. 2003.

SHI, Y.; ZHENG, W. ; ROCK, K. L. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, Dec 19, p. 14590-14595. 2000.

SHIH, C.; PADHY, L. C.; MURRAY, M. ; WEINBERG, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. **Nature**, v. 290, n. 5803, Mar 19, p. 261-264. 1981.

SIMPSON, R.J. Introduction to proteomics. In: Proteins and proteomics: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. Cap. 1, p. 1-39.

SINGH, R.; GEORGE, J. ; SHUKLA, Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. **Cell Div**, v. 5, n., p. 4. 2010.

SLEE, E. A.; HARTE, M. T.; KLUCK, R. M.; WOLF, B. B.; CASIANO, C. A.; NEWMYER, D. D.; WANG, H. G.; REED, J. C.; NICHOLSON, D. W.; ALNEMRI, E. S.; GREEN, D. R. ; MARTIN, S. J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J Cell Biol**, v. 144, n. 2, Jan 25, p. 281-292. 1999.

SONNENSCHNEIN, C. ; SOTO, A. M. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 5, Oct, p. 372-377. 2008.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; BRUMATTI, G.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ZANI, C. L. ; AMARANTE-MENDES, G. P. Myriadenolide, a labdane diterpene isolated from *Alomia myriadenia* (asteraceae) induces depolarization of mitochondrial membranes and apoptosis associated with activation of caspases-8, -9, and -3 in Jurkat and THP-1 cells. **Exp Cell Res**, v. 290, n. 2, Nov 1, p. 420-426. 2003.

SPANO, D.; RUSSO, R.; DI MASO, V.; ROSSO, N.; TERRACCIANO, L. M.; RONCALLI, M.; TORNILLO, L.; CAPASSO, M.; TIRIBELLI, C. ; IOLASCON, A. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. **Mol Med**, v. 16, n. 3-4, Mar, p. 102-115. 2010.

STENNICKE, H. R.; JURGENSMEIER, J. M.; SHIN, H.; DEVERAUX, Q.; WOLF, B. B.; YANG, X.; ZHOU, Q.; ELLERBY, H. M.; ELLERBY, L. M.; BREDESEN, D.; GREEN, D. R.; REED, J. C.; FROELICH, C. J. ; SALVESEN, G. S. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. **J Biol Chem**, v. 273, n. 42, Oct 16, p. 27084-27090. 1998.

STENNICKE, H. R. ; SALVESEN, G. S. Properties of the caspases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1387, n. 1-2, Sep 8, p. 17-31. 1998.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J. ; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, Apr 9, p. 719-724. 2009.

SZOKE, T.; KAYSER, K.; TROJAN, I.; KAYSER, G.; FURAK, J.; TISZLAVICZ, L.; BAUMHAKEL, J. D. ; GABIUS, H. J. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 31, n. 5, May, p. 783-787. 2007.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P. ; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, Mar, p. 231-241. 2008.

TEMKIN, V.; HUANG, Q.; LIU, H.; OSADA, H. ; POPE, R. M. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 6, Mar, p. 2215-2225. 2006.

THE history of cancer. American Cancer Society Inc. New York, 22 mar. 2010. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp>. Acesso em: 23 jun. 2010.

THIERY, J. P. ; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, Feb, p. 131-142. 2006.

TOILLON, R. A.; MAGNE, N.; LAIOS, I.; CASTADOT, P.; KINNAERT, E.; VAN HOUTTE, P.; DESMEDT, C.; LECLERCQ, G. ; LACROIX, M. Estrogens decrease gamma-ray-induced senescence and maintain cell cycle progression in breast cancer cells independently of p53. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 67, n. 4, Mar 15, p. 1187-1200. 2007.

TOKALOV, S. V.; PIECK, S. ; GUTZEIT, H. O. Varying responses of human cells with discrepant p53 activity to ionizing radiation and heat shock exposure. **Cell Prolif**, v. 40, n. 1, Feb, p. 24-37. 2007.

TRINCHIERI, G. ; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 3, Mar, p. 179-190. 2007.

TYRSINA, E. G.; SLANINA, S. V.; KAKPAKOVA, E. S.; KALENDO, G. S.; KAN, N. G.; TYRSIN, O. Y. ; RYSKOV, A. P. Isolation and characterization of highly radioresistant malignant hamster fibroblasts that survive acute gamma irradiation with 20 Gy. **Radiat Res**, v. 164, n. 6, Dec, p. 745-754. 2005.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; TAMM, C.; HEIDARI, N.; ORRENIUS, S. ; ZHIVOTOVSKY, B. DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 3, Mar, p. 555-566. 2008.

VALACHIS, A.; MAURI, D.; POLYZOS, N. P.; MAVROUDIS, D.; GEORGOULIAS, V. ; CASAZZA, G. Partial Breast Irradiation or Whole Breast Radiotherapy for Early Breast Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Breast J**, v., n., Feb 23, p. 2010.

VAN DEN BRULE, F.; CALIFICE, S.; GARNIER, F.; FERNANDEZ, P. L.; BERCHUCK, A. ; CASTRONOVO, V. Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. **Lab Invest**, v. 83, n. 3, Mar, p. 377-386. 2003.

VARGAS-ROIG, L. M.; GAGO, F. E.; TELLO, O.; AZNAR, J. C. ; CIOCCA, D. R. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. **Int J Cancer**, v. 79, n. 5, Oct 23, p. 468-475. 1998.

VARGO-GOGOLA, T. ; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, Sep, p. 659-672. 2007.

VARMARK, H.; SPARKS, C. A.; NORDBERG, J. J.; KOPPETSCH, B. S. ; THEURKAUF, W. E. DNA damage-induced cell death is enhanced by progression through mitosis. **Cell Cycle**, v. 8, n. 18, Sep 15, p. 2951-2963. 2009.

VEGLIA, F.; VINEIS, P.; OVERVAD, K.; BOEING, H.; BERGMANN, M.; TRICHOPOULOU, A.; TRICHOPOULOS, D.; PALLI, D.; KROGH, V.; TUMINO, R.; LINSEISEN, J.; STEINDORF, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; TJONNELAND, A.; GONZALEZ, C. A.; MARTINEZ, C.; DORRONSORO, M.; BARRICARTE, A.; CIRERA, L.; QUIROS, J. R.; DAY, N. E.; SARACCI, R. ; RIBOLI, E. Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. **Epidemiology**, v. 18, n. 6, Nov, p. 769-775. 2007.

VERAS, E.; MALPICA, A.; DEEVERS, M. T. ; SILVA, E. G. Mitosis-specific marker phospho-histone H3 in the assessment of mitotic index in uterine smooth muscle tumors: a pilot study. **Int J Gynecol Pathol**, v. 28, n. 4, Jul, p. 316-321. 2009.

VERBRUGGE, I.; DE VRIES, E.; TAIT, S. W.; WISSINK, E. H.; WALCZAK, H.; VERHEIJ, M. ; BORST, J. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. **Oncogene**, v. 27, n. 5, Jan 24, p. 574-584. 2008.

VERONESI, U.; ORECCHIA, R.; LUINI, A.; GALIMBERTI, V.; GATTI, G.; INTRA, M.; VERONESI, P.; LEONARDI, M. C.; CIOCCA, M.; LAZZARI, R.; CALDARELLA, P.; SIMSEK, S.; SILVA, L. S. ; SANCES, D. Full-dose intraoperative radiotherapy with electrons during breast-conserving surgery: experience with 590 cases. **Ann Surg**, v. 242, n. 1, Jul, p. 101-106. 2005.

VIT, J. P.; GUILLOUF, C. ; ROSSELLI, F. Futile caspase-8 activation during the apoptotic cell death induced by DNA damaging agents in human B-lymphoblasts. **Exp Cell Res**, v. 269, n. 1, Sep 10, p. 2-12. 2001.

WALSH, J. G.; CULLEN, S. P.; SHERIDAN, C.; LUTHI, A. U.; GERNER, C. ; MARTIN, S. J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 35, Sep 2, p. 12815-12819. 2008.

WCR_2008. World Cancer Report 2008. BOYLE, P.; LEVIN, B. (eds). Lion: International Agency for Research on Cancer, 2008.

WENDT, J.; RADETZKI, S.; VON HAEFEN, C.; HEMMATI, P. G.; GUNER, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DORKEN, B. ; DANIEL, P. T. Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. **Oncogene**, v. 25, n. 7, Feb 16, p. 972-980. 2006.

WICHA, M. S.; LIU, S. ; DONTU, G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. **Cancer Res**, v. 66, n. 4, Feb 15, p. 1883-1890; discussion 1895-1886. 2006.

WILLIS, R. A. The spread of tumors in the human body. Londres: Butterworth & Co, 1952.

WOLFORT, R.; DE BENEDETTI, A.; NUTHALAPATY, S.; YU, H.; CHU, Q. D. ; LI, B. D. Up-regulation of TLK1B by eIF4E overexpression predicts cancer recurrence in irradiated patients with breast cancer. **Surgery**, v. 140, n. 2, Aug, p. 161-169. 2006.

WU, W.; TANG, X.; HU, W.; LOTAN, R.; HONG, W. K. ; MAO, L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Clin Exp Metastasis**, v. 19, n. 4, p. 319-326. 2002.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. ; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v. 68, n., p. 251-306. 1980.

YANO, Y.; YOSHIDA, K.; OSAKI, A.; TOGE, T.; TAHARA, H.; IDE, T. ; YASUI, W. Expression and distribution of human telomerase catalytic component, hTERT, in human breast tissues. **Anticancer Res**, v. 22, n. 6C, Nov-Dec, p. 4101-4107. 2002.

YARNOLD, J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. **Radiother Oncol**, v. 44, n. 1, Jul, p. 1-7. 1997.

YU, J. I.; CHOI, D. H.; PARK, W.; HUH, S. J.; CHO, E. Y.; LIM, Y. H.; AHN, J. S.; YANG, J. H. ; NAM, S. J. Differences in prognostic factors and patterns of failure between invasive micropapillary carcinoma and invasive ductal carcinoma of the breast: Matched case-control study. **Breast**, v., n., Mar 19, p. 2010.

ZHANG, D.; TAI, L. K.; WONG, L. L.; CHIU, L. L.; SETHI, S. K. ; KOAY, E. S. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 11, Nov, p. 1686-1696. 2005.

ZHANG, F.; ZHANG, L.; ZHANG, B.; WEI, X.; YANG, Y.; QI, R. Z.; YING, G.; ZHANG, N. ; NIU, R. Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the multidrug resistant human breast cancer cells. **J Proteome Res**, v. 8, n. 11, Nov, p. 5041-5047. 2009.

ZHANG, R.; KANG, K. A.; PIAO, M. J.; KO, D. O.; WANG, Z. H.; LEE, I. K.; KIM, B. J.; JEONG, I. Y.; SHIN, T.; PARK, J. W.; LEE, N. H. ; HYUN, J. W. Eckol protects V79-4 lung fibroblast cells against gamma-ray radiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species and inhibiting of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 591, n. 1-3, Sep 4, p. 114-123. 2008.

ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z. Q. ; THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes Dev**, v. 18, n. 11, Jun 1, p. 1272-1282. 2004.

ANEXO B – RELATÓRIO DE EXAME ANATOMOPATOLÓGICO MGSO-3
CENTRO DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Dr. ~~XXXXXXXXXXXXXXX~~
~~XXXXXXXXXXXXXXX~~

Paciente:	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Ent:	XX
Clínica Dr(a):	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	EXT	XX
Procedência:	SANTA CASA EXTERNO	Admissão:	XX/XX/XXXX
Convênio:	XXX	Reg.:	XXXXXXXXXX
Exame:	EXAME ANATOMO PATOLOGICO POR ORGAO, BIOP		
Material:	MAMA ESQUERDA		

R E L A T Ó R I O

RESUMO CLÍNICO:

MACROSCOPIA:

Material recebido em frasco rotulado e constituído por retalho de pele mamário, medindo 4,5x3,5x1,5 cm.

Aos cortes apresenta lesão nodular e firme em margem inferior, medindo 1,0 cm.

MICROSCOPIA:

Cortes histológicos do material mostram tecido fibro-adiposo mamário contendo carcinoma intraductal de alto grau, com focos de necrose central, tipo comedocarcinoma, sem áreas de invasão franca do estroma, na amostra. A lesão alcança as margens.

CONCLUSÃO:

Carcinoma intraductal de mama, de alto grau, tipo comedocarcinoma.

Belo Horizonte, 20 de maio de 2009

O presente laudo é uma análise interpretativa com aspectos subjetivos dos elementos morfológicos expressos na amostra, sendo consequência de dados clínicos, laboratoriais e morfológicos. Os diagnósticos podem variar na dependência do patologista examinador, dos informes clínicos, das imagens anexas, do emprego de técnicas especiais (ex. imunohistoquímica) e da evolução científica. Quaisquer dúvidas ou discordâncias frente ao laudo devem ser imediatamente comunicadas, postergando-se medidas terapêuticas pois a sensibilidade e especificidade do método histopatológico não são absolutas, podendo requerer revisões de lâminas ou novos cortes para completa elucidação do caso

ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO

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](#)