



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Marcadores moleculares nas células estaminais do cancro da mama triplo negativo *versus* hormonodependente.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho (Universidade de Coimbra)

Tânia Alves Gonçalves Costa

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta conhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied in the condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment.

“The greatest glory in living lies not in never falling, but in rising every time we fall.”

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Apesar do seu caráter individual, ao fim deste ano de trabalho e após a finalização desta dissertação, não posso deixar de expressar o meu muito obrigado a várias pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela oportunidade que me deu ao permitir e ao aceitar na sua equipa, pela orientação, disponibilidade e apoio prestado ao longo deste trabalho. Gostava ainda de agradecer as revisões e críticas construtivas e a partilha de conhecimento e experiência científica.

Ao Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho, do Departamento Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra por ter aceite ser orientador desta dissertação, pela sua disponibilidade e partilha de conhecimento e experiência científica.

Ao Mestre Rui Oliveira, Interno de Anatomopatologia, por toda a ajuda e tempo prestado a este trabalho relativamente aos estudos de imunocitoquímica.

À Mestre Mafalda Laranjo, tenho muito que agradecer. Pela orientação informal. Pelo tempo que me disponibilizou para me ensinar, para partilhar o seu conhecimento científico comigo, para me ajudar. Por sempre ouvir e considerar a minha opinião. Pela sua paciência, por me fazer ir mais além e fazer com que me superasse profissionalmente e também como indivíduo. Por todo o apoio que me disponibilizou durante este ano e por nunca estar indisponível para as minhas dúvidas.

À Mestre Maria João Carvalho por me ter auxiliado ao longo deste trabalho, por me ter transmitido o seu conhecimento científico. Por nunca me ter recusado ajuda, bem como ter estado sempre disponível para o que fosse preciso, incluindo a revisão deste manuscrito.

À Professora Doutora Margarida Abrantes pelo seu bom humor, por ter estado sempre disponível e pelo conhecimento científico que me transmitiu ao longo deste ano.

Ao Mestre João Casalta-Lopes agradeço principalmente a ajuda cedida no tratamento estatístico dos resultados. Agradeço também pela boa disposição, pelas brincadeiras e pelas coisas doces que por magia pareciam no *Open Space* ao fim de semana.

Às Mestres Ana Brito, Catarina Mamede, Salomé Pires e ao Mestre Fernando Mendes pela forma calorosa como me receberam, pela boa disposição diária e por me ajudarem sempre que possível e pelos conselhos dados tanto a nível científico como pessoal.

À Ana Frias pelas brincadeiras, pelo bom ambiente e pela ajuda prestada neste trabalho na parte de radioterapia. Ao João Amorim, por me fazer companhia e pela ajuda no laboratório.

À Ana Isabel, por ter as palavras certas e pela ajuda, à Ana Cláudia pelo sorriso constante, à Ana Filipa que devia ter um parágrafo mas desta vez vai apenas um muito obrigado por teres aparecido e teres feito parte do nosso grupo, à Denise por estar sempre disposta a fazer-nos sorrir e a levantar a moral, ao Gonçalo Brites pela sua energia, à Kathleen por sempre me ter ajudado e por animar ainda mais os meus dias, ao Ricardo Teixeira por me aturar tantos anos e ainda ter a capacidade de o continuar a fazer, ao João pelos abraços e pela amizade, à Sara por ter sempre estado ao meu lado e por ter entrado na minha vida, à Susann que esteve cá pouco tempo mas que deixou muitas saudades ao Telmo por tudo aquilo que construímos e vamos construir e pela amizade destes anos, ao Tiago Sales por tudo o que vivemos este ano e ainda vamos viver para o

próximo, por me alegrares a vida e torna-la diferente. Somos uma grande equipa de amigos que nunca vou esquecer.

Ao Gonçalo Cristóvão por estar sempre ao meu lado ao longo destes anos e saber que tenho sempre um amigo fiel em ti. À Cláudia Amaral, ao Oliveira, ao Rui Marques, à Catarina Rebelo e a todas as pessoas da SDUC que mesmo um pouco separadas sempre me deram força e suporte.

Em último mas não menos importante à minha família, especialmente à minha Mãe, que viveu as minhas alegrias e tristezas que me apoiou em tudo mas que me continua a educar e a saber quando dizer que não, que nunca permitiu que nada me faltasse. Obrigado pelo amor, carinho e amizade.

RESUMO

ABSTRACT

RESUMO

Na prática clínica, o cancro da mama é estratificado em três grupos: cancros que expressam recetores hormonais (RH), cancros que sobreexpressam HER-2 e os cancros triplos negativos (TN) que não expressam nem RH, nem HER-2. Esta estratificação tem implicações diagnósticas e terapêuticas. A recente teoria das células estaminais do cancro (CSC) refere-se à existência de um pequeno grupo populacional de células que possuem características de células estaminais. Há evidências de que as CSC são responsáveis pela progressão do tumor, por recidivas e pela resistência à terapia.

Este trabalho surge com vários objetivos, na perspetiva de comparar as células tumorais da mama que expressam RH e as TN, nomeadamente, isolar células estaminais derivadas destes tipos de tumores e células diferenciadas a partir destas, estudar o seu perfil fenotípico no que concerne à expressão de recetores com relevância clínica e de marcadores como a proteína P53 e ALDH e ainda comparar a resposta das linhas celulares à radioterapia.

Para a realização destes objetivos utilizaram-se as linhas celulares HCC1806 e MCF7, representativas do cancro da mama TN e do cancro da mama que expressa RH, respetivamente. Estas células foram estudadas por imunocitoquímica (ICQ) de modo a conhecer as suas características morfológicas, avaliar e confirmar a expressão de RE- α , de RP, de P53 e de Ki-67. Ambas as linhas celulares foram submetidas ao protocolo de formação de mamosferas. A primeira geração de mamosferas (MS1) foi posteriormente cultivada em condições aderentes (G1). Este procedimento foi repetido mais duas vezes obtendo-se as respetivas gerações denominadas por MS2, MS3, G2 e G3. Com estas populações celulares obtiveram-se extratos de proteína total que foram utilizados para detetar e quantificar várias proteínas: ALDH, RE- α e RE- β , RP, HER-2 e P53. Além

destes procedimentos, as linhas celulares HCC1806 e MCF7 ainda foram submetidas a radioterapia e a sua resposta foi avaliada pelo ensaio clonogénico.

A ICQ revelou que estas células apresentam características de células tumorais, sendo a linha celular HCC1806 mais indiferenciada. A avaliação da expressão da ALDH, um marcador comum para células estaminais, confirmou a obtenção de CSC pelo protocolo de formação de esferas. Verificou-se também uma diferença de expressão entre a linha MCF7 e a linha HCC1806, em que a última tem uma expressão mais elevada o que aponta para uma maior estaminalidade (“*stemness*”) dos tumores triplos negativos. Os RE- α , RP e HER-2 não são expressos em HCC1806 e populações derivadas. O RE- β , expresso em ambas as linhas celulares, verificou-se diminuído nas CSC, nomeadamente, MS1, MS2 e MS3. Nas populações derivadas aderentes, G1, G2 e G2, verifica-se uma sobreposição com o fenótipo original. Este perfil de expressão também se verificou em relação às células da linha MCF7 e populações derivadas para os marcadores RE- α , RP e HER-2, bem como, para a P53. Os resultados obtidos apontam para o perfil de sub/desdiferenciação das CSC que se traduz por uma perda do fenótipo característico da célula e, certamente, tem implicações no comportamento clínico dos tumores.

No que concerne à resposta à radioterapia verificou-se uma maior suscetibilidade e sensibilidade por parte das células triplas negativas. Esta resposta pode, em parte, ser justificada pelo superior índice proliferativo por parte das células triplas negativas.

Os tumores da mama são um grupo heterogéneo. O isolamento de CSC e a sua caracterização é mais um patamar decisivo no esclarecimento da génese do cancro e da previsão da resposta à terapêutica.

ABSTRACT

In clinical practice breast cancer is stratified into three groups: cancers that express hormonal receptors (HR), cancers that overexpress HER-2 and the triple negative (TN), that do not express RH or HER-2. This stratification has diagnostic and therapeutic implications. The recent theory of cancer stem cells (CSC) refers to the existence of a small population of cells having stem cell characteristics. There is evidence that CSC are responsible for tumor progression, recurrence and resistance to therapy.

This work comes up with several objectives in the perspective of comparing breast tumor cells that express HR and TN ones, namely, isolating stem cells derived from these types of tumors and cells differentiated from the latter, to study their phenotypic profile regarding clinically relevant receptors and markers such as P53 and ALDH, and to compare the response to radiotherapy of the cell lines.

To achieve these objectives we used cell lines HCC1806 and MCF7, representing the TN breast cancer and breast cancer that express HR, respectively. These cells were studied by immunocytochemistry (ICC) in order to evaluate their morphological characteristics, assess and confirm the expression of ER- α , PR, p53 and Ki-67. Both cell lines were subjected to mammosphere formation protocol. The first generation of mammospheres (MS1) was subsequently grown in adherent conditions (G1). This procedure was repeated twice to obtain the corresponding MS2, MS3, G2 and G3. With these cell populations total protein extracts were prepared and used to detect and quantify various proteins: ALDH, ER- α , ER- β , PR, HER-2 and p53. Moreover, cell lines HCC1806 and MCF7 were submitted to radiotherapy and their response assessed by the clonogenic assay.

ICC revealed these cells have characteristics of aggressive tumor cells, being HCC1806 the more undifferentiated. Evaluation of the expression of ALDH, a common marker for stem cells, confirmed the CSC phenotype of cells submitted to the mammosphere forming protocol. There was also a difference in expression between MCF7 and HCC1806, wherein the latter has a higher expression which indicates a greater stemness. ER- α , PR and HER-2 are not expressed in HCC1806 and derived populations. The RE- β expressed in both cell lines was found to be diminished in the CSC, namely, MS1, MS2 and MS3. In the derived adherent populations G1, G2 and G3 there is an overlap with the original phenotype. This expression profile was also observed in MCF7 and derived adherent populations for ER- α , PR and HER-2 as well as P53. These results point to the profile of dedifferentiation of CSC which translates to a loss of the phenotypic characteristic and certainly has implications in clinical behavior of tumors.

Regarding the response to radiotherapy, there was a greater susceptibility by triple negative cells. This response can, at least partially, be explained by the higher proliferative index by the triple negative cells.

Breast cancer tumors are a heterogeneous disease. The CSC isolation and characterization is one decisive step in understanding the origin of cancer and the of response to therapy.

ÍNDICE

ÍNDICE

Agradecimentos	vii
Resumo	xv
<i>Abstract</i>	xvii
Índice	xix
Abreviaturas	xxiii
Introdução	29
O Cancro	31
Cancro da mama	32
Histologia do cancro da mama	34
Marcadores moleculares	35
Recetor de estrogénio	36
Recetor de progesterona	38
HER-2	39
Classificação molecular	41
Células estaminais e cancro da mama	43
Outros marcadores	48
P53	48
ALDH	51
Terapêutica no cancro da mama	53
Objetivos	57
Materiais e Métodos	61
Cultura de células	63
Viabilidade celular	64

Caracterização imunocitoquímica	65
Isolamento de células estaminais do cancro	67
<i>Western blot</i>	68
Resposta à radioterapia	73
Análise estatística	77
Resultados	79
Citoquímica e imunocitoquímica	81
Isolamento de CSC	86
Expressão de proteínas em CSC	87
Resposta à radioterapia	98
Discussão	101
Conclusões	115
Bibliografia	119

ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ALDH1	Aldeído desidrogenase isoforma 1
ALDH2	Aldeído desidrogenase isoforma 2
ALDH3	Aldeído desidrogenase isoforma 3
ALDH4	Aldeído desidrogenase isoforma 4
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BRAC1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRAC2	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
CAPS	<i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDK2	<i>Ciclin-2 dependent kinase protein</i>
CSC	<i>Cancer stem cells / células estaminais do cancro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Endothelial growth factor</i>
EMT	Transição epitelial – mesenquimal
EP	Eficiência da placa
ErbB	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ErbB1	<i>Epidermal growth factor receptor isoform 1</i>

ErbB2	<i>Epidermal growth factor receptor isoform 2</i>
ErbB3	<i>Epidermal growth factor receptor isoform 3</i>
ErbB4	<i>Epidermal growth factor receptor isoform 4</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fator de sobrevivência
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing hormone</i>
G1	Geração 1, células aderentes derivadas de MS1
G2	Geração 2, células aderentes derivadas de MS2
G3	Geração 3, células aderentes derivadas de MS3
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
Hh	Vias de Hedgehog
ICQ	Imunocitoquímica
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
kDa	Kilo Dalton
Ki-67	Proteína nuclear indicadora de proliferação celular
Km	Constante de Michaelis
MAPK	<i>Mitogen- activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MS1	Mamosferas de geração 1
MS2	Mamosferas de geração 2
MS3	Mamosferas de geração 3
NOS	<i>Not otherwise specified</i>

P53	Proteína P53
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RE	Recetor de estrogénio
RE- α	Recetor de estrogénio alfa
RE- β	Recetor de estrogénio beta
RH	Recetores hormonais
RIPA	Tampão de radioimunoprecipitação
RP	Recetor de progesterona
RP-A	Recetor de progesterona isoforma A
RP-B	Recetor de progesterona isoforma B
RPMI	<i>Rooswell Park Memorial Institute</i>
RT	Radioterapia
SERMS	Moduladores seletivos dos recetores de estrogénios
SERDs	Reguladores seletivos dos recetores de estrogénios
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline Tween-20</i>
TN	Cancro da mama triplo negativo
TGF- α	<i>Transforming growth factor alfa</i>

INTRODUÇÃO

O Cancro

O cancro é uma das doenças que mais afeta a nossa sociedade. Esta patologia caracteriza-se por uma proliferação celular descontrolada, que normalmente é regulada por vários fatores de crescimento e vias moleculares, muitas delas ainda por definir. Uma das grandes diferenças de crescimento e de proliferação das células tumorais relativamente às células normais é o facto de as primeiras serem capazes de evitar a apoptose. Estas células têm capacidade de invadir e de se disseminar por vários tecidos do corpo através do sangue e do sistema linfático, formando metástases.

O principal fator que leva ao desenvolvimento do cancro são mutações no DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*). As mutações podem levar à ativação de oncogenes, genes que são responsáveis pela aquisição de características tumorais. A célula tem uma maquinaria para corrigir mutações que ocorrem no DNA, porém nem sempre estes processos de reparação são eficazes podendo levar a um crescimento de uma massa celular que não tem as características normais, ou seja, a formação de um tumor ou neoplasia.^{1,2}

No cancro, vários fatores externos e internos podem influenciar a ocorrência de mutações no DNA. Entre os fatores externos podemos considerar o tabaco, a exposição a químicos, as infeções e a radiação, enquanto em relação aos fatores internos as mutações hereditárias, as mutações adquiridas e a exposição a hormonas devem ser tidos em conta.³

Cancro da mama

O cancro de mama é o segundo mais frequente e comum no mundo. Porém é o mais frequente entre indivíduos do género feminino. Em 2012 estimou-se que 1,67 milhões de novos casos foram diagnosticados o que representa cerca de 25% de todos os tumores.

A figura 1 representa a incidência e mortalidade de cancro da mama no ano 2012. Nas regiões desenvolvidas existem cerca de 794000 novos casos e nas regiões menos desenvolvidas existem cerca de 883000 novos casos.⁴

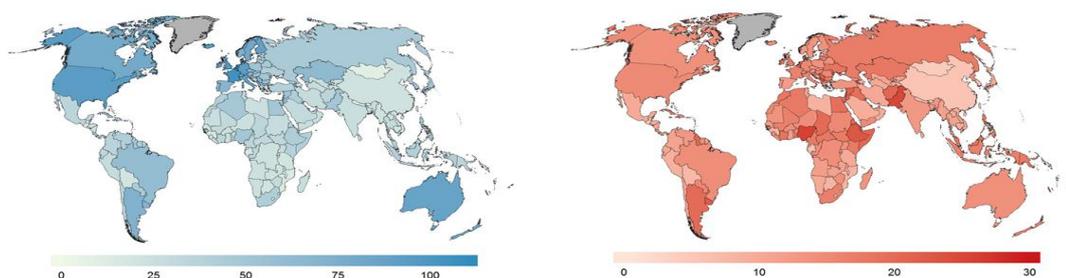


Figura 1: Representação geográfica da distribuição mundial de cancro da mama. A azul está representada a incidência enquanto a vermelho encontra-se representada a mortalidade. Dados referentes a 2012. Imagens adaptadas de Ferlay *et al.*, 2013. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>, acedido em 09/07/2014.⁴

O cancro da mama é causa de morte mais frequente nas regiões não desenvolvidas em comparação com outros tumores malignos no sexo feminino, o que corresponde a 14,3%.⁴ Nas regiões desenvolvidas é a segunda causa de morte a seguir ao cancro do pulmão com uma taxa de 15,4%.⁴ Estas diferenças parecem estar relacionadas com a variabilidade dos cuidados de saúde disponíveis.⁴

Em Portugal este cancro é o que mais afeta as mulheres conforme é mostrado pelo Globocan (dados de 2012) e como representado na figura 2.

Existem três fatores principais que podem levar ao desenvolvimento do cancro da mama, sendo estes genéticos, ambientais e hormonais. Porém em termos gerais podemos dizer que há fatores de risco que podem levar ao desenvolvimento desta doença como a idade, a etnia ou a raça, o género, e a história familiar. Dentro dos fatores hormonais e ambientais o cancro da mama é influenciado por hormonas endógenas do sistema reprodutivo, mediado pela indução de fatores de crescimento, fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular e fatores anti-apoptóticos.^{5,6}

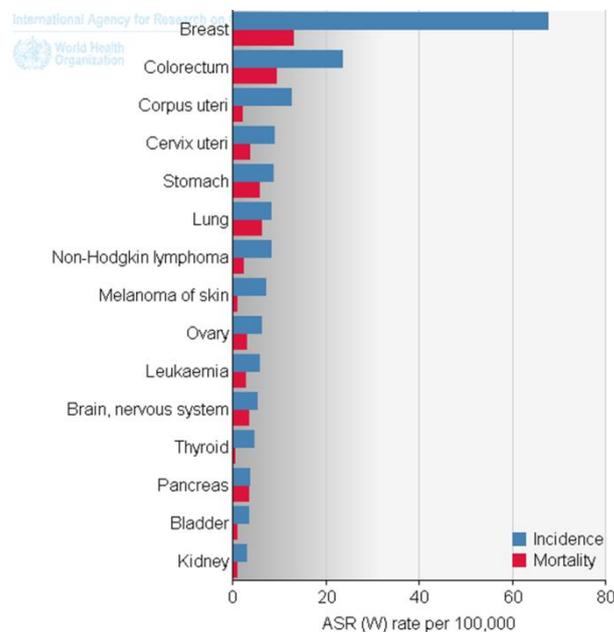


Figura 2: Representação da incidência de diferentes tipos de cancro em mulheres portuguesas, dados de 2012. Imagem adaptada de Ferlay *et al.*, 2013. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>, acessado a 09/07/2014.⁴

Relativamente ao fator genético, vários estudos têm implicado diversos genes nesta patologia, no entanto destacam-se dois genes que são comuns em vários casos de estudo, em famílias em que ocorreram quatro ou mais casos de cancro da mama entre familiares próximos. Estes dois genes, envolvidos no cancro da mama hereditário, descritos em 1990, designam-se *breast cancer 1, early onset* (BRCA1) e *breast cancer*

2, *early onset* (BRCA2).^{7,8} Estes genes são supressores tumorais que interagem com proteínas nucleares. O gene BRCA1 situa-se no braço longo do cromossoma 17 e o BRCA2 situa-se no braço longo do cromossoma 13. Geralmente a mutação no gene BRCA1 está associado a risco de cancro da mama e do ovário. A mutação no gene BRCA2 está associada de igual modo a um elevado risco de desenvolvimento de cancro da mama.⁹ As mutações nestes genes podem ser de diversos tipos, nomeadamente, de deleção ou de inserção de vários locus. As mutações nestes genes são responsáveis por cerca de 8% de todos os cancros da mama e por 25 a 40% dos casos de cancro da mama em doentes até 35 anos de idade e com história familiar.⁹

O prognóstico do cancro da mama é influenciado pela idade, grau histológico, expressão dos recetores hormonais (de estrogénios e de progesterona), bem como a sobreexpressão de HER-2, (do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*), sendo um marcador molecular do cancro da mama.⁶

Histologia do cancro da mama

Do ponto de vista histológico, o cancro da mama pode ser classificado em dois grandes grupos, o *in situ* e o invasivo. O carcinoma *in situ* não ultrapassa a membrana basal do epitélio, ao contrário do invasivo que a ultrapassa e tem potencial de metastização.

O carcinoma *in situ* é ainda subclassificado em ductal, o mais comum, e em lobular.¹⁰ O carcinoma invasivo é subdividido em carcinoma invasivo de nenhum tipo especial (NOS, do inglês *not otherwise specified*, anteriormente designado por ductal), lobular, tubular, medular, mucinoso, misto e ainda outros subtipos mais raros. Entre estes subtipos os mais comuns são o carcinoma invasivo NOS e o carcinoma lobular

invasivo. O carcinoma invasivo NOS representa 70 a 80% dos casos e o carcinoma lobular invasivo representa apenas 5 a 15%.¹¹

Para além deste tipo de classificação histológica recentemente têm sido propostas classificações com base em marcadores moleculares.

Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são diferentes moléculas encontradas nos tecidos biológicos, inclusivamente a nível do tumor. Os marcadores são importantes uma vez que podem ajudar a prever o prognóstico do cancro da mama bem como a orientação terapêutica. Na prática clínica está disseminada a pesquisa de recetores hormonais (RH), nomeadamente de recetores de estrogénios (RE) e de progesterona (RP) e também a sobreexpressão de HER-2.¹²

Os recetores hormonais influenciam o crescimento e a divisão das células. No cancro da mama os recetores hormonais preponderantes são o recetor de estrogénio (RE) e o recetor de progesterona (RP). Estes dois tipos de recetores fazem parte da superfamília de recetores hormonais nucleares, os quais representam fatores de transcrição quando ativados pelo ligando.¹³

É fundamental identificar a presença ou a ausência destes recetores nas células do cancro da mama. Se um ou ambos os tipos de recetores se encontrarem na célula o tratamento adjuvante inclui hormonoterapia, prevendo-se boa resposta, com menos efeitos secundários que a quimioterapia convencional e um melhor prognóstico.¹⁴

Recetor de estrogénio

Os recetores de estrogénio foram inicialmente descritos em 1962. Ainda no mesmo ano Greene *et al.* conseguiram clonar o gene de uma das isoformas. Nos primeiros estudos detetou-se uma elevada concentração de estrogénio no cancro da mama e em órgãos alvo desta hormona, o que levou à percepção de que há uma dependência dos estrogénios no crescimento e no desenvolvimento do cancro da mama.¹⁵

Os recetores de estrogénio são proteínas intracelulares, dos quais existem duas isoformas, o RE- α e o RE- β . O RE- α foi a primeira das isoformas a ser descoberta e, neste momento, é a mais utilizada na clínica para o diagnóstico e orientação do tratamento do cancro da mama. O RE- α contém cerca de 595 aminoácidos e o gene que codifica esta proteína encontra-se no braço longo do cromossoma 6, como está representado na figura 3.¹⁶

A segunda isoforma do RE, o RE- β , apenas foi descoberta em 1993, quase três décadas depois da primeira, tendo sido clonado pela primeira vez em 1996.^{17,18} O RE- β contém cerca de 548 aminoácidos e o seu gene encontra-se situado no braço longo do cromossoma 14, como está representado também na figura 3.^{19,20}

Existe uma homologia entre as duas isoformas do RE de cerca de 47%. Na estrutura de ambos existe um domínio central que se liga ao DNA, uma região funcional C que se situa após o domínio central e com cerca de 95% de homologia, um terminal carboxílico, onde se situa um local de ligação hormonal e, ainda, um domínio de ligação do ligando ao recetor, com homologia de 53%.²¹ A diferença entre a homologia e as dimensões dos dois tipos de RE, em que o RE- α apresenta maior dimensão, mostra que eles terão fisiologias e afinidades seletivas distintas para os mesmos ligandos.¹³ A

expressão do RE- β encontra-se associada a câncros da mama mais agressivos.²² Por esse motivo foi proposto que o RE- β poderá ser um bom marcador para estes tumores, porém neste momento esta informação ainda é controversa.

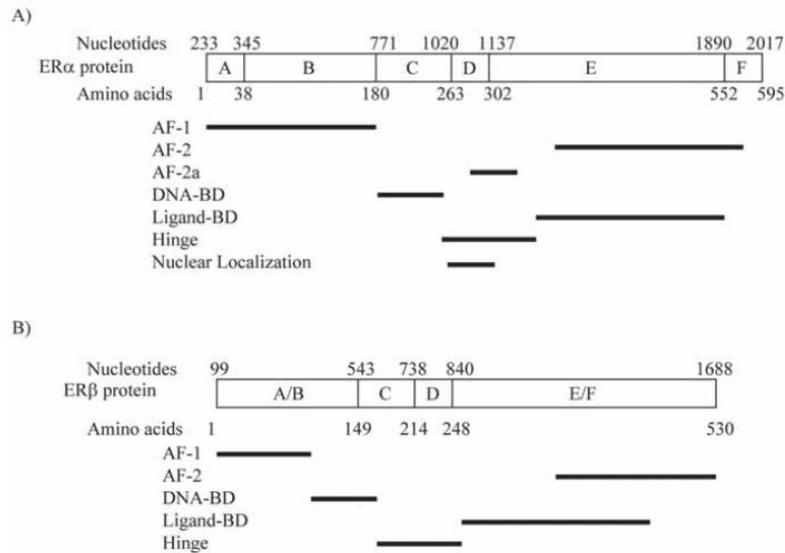


Figura 3: Representação dos genes de RE- α e de RE- β respetivamente. Imagem retirada de Herynk *et al.*, 2007.²³

Foram realizados alguns estudos com o DNA complementar dos RE e verificou-se a existência de uma alteração da estrutura genómica dos recetores associados ao cancro da mama. Mais recentemente realizaram-se novos estudos baseados nesta hipótese não sendo confirmados os resultados anteriores.^{24,25} Pensa-se que a ausência de RE em alguns tumores da mama é devido a alterações da transcrição e a fenómenos de metilação no seu gene.^{26,27,28}

A transcrição do RE regula componentes de vias transdutoras de sinal que promovem a proliferação e a sobrevivência das células tumorais da mama. O estrogénio entra na célula e ao ligar-se ao RE promove a homodimerização ou a heterodimerização de recetores e, conseqüentemente, a ligação ao DNA através do domínio de ligação ao DNA. Esta ativação vai levar à produção de fatores de crescimento, como o TGF- α (do

inglês, *transforming growth factor alfa*) e o IGF (do inglês, *insulin-like growth factor*), de recetores de fatores de crescimento tirosina cinase e de intermediários de sinalização celular, podendo também inibir alguns elementos.^{29,30}

Os carcinomas que expressam este marcador são cerca de 75% dos casos de cancro de mama, sendo que cerca de 30 a 40% dos doentes com este carcinoma têm uma melhor resposta à hormonoterapia.^{31,32} A terapia hormonal comparada com a quimioterapia clássica é menos tóxica e o seu efeito supressor pode ser mais duradouro. Foi provado que a terapia hormonal, como terapia adjuvante após cirurgia, ajuda a reduzir o aparecimento de recidivas. Esta terapia tem como objetivo a inibição ou o bloqueio das cascatas de sinalização envolvidas na proliferação do cancro da mama.¹⁴

Recetor de progesterona

A progesterona influencia o desenvolvimento de vários tecidos, entre eles a glândula mamária. A progesterona através dos seus metabolitos ajuda ao desenvolvimento do cancro e à inibição de agentes reguladores, embora ainda não esteja completamente esclarecido como estes são ativados.³³

Os RP foram descobertos em 1970, e verificou-se que apresentam grande afinidade de ligação à progesterona. O gene que codifica o RP localiza-se no braço longo do cromossoma 11, como está representado na figura 4.³⁴ O gene do qual o RP é transcrito contém três locais independentes, sendo possível a expressão de assim três isoformas, nomeadamente, RP-A, RP-B e RP-C.³⁵ As isoformas mais comuns na mama são o RP-A e o RP-B. O RP-A tem menos 165 aminoácidos no N-terminal ficando com um peso molecular final de 94 kDa, enquanto a isoforma RP-B tem um peso molecular de 116 kDa. Outra diferença entre estas duas isoformas é a sua localização celular, a

RP-A localiza-se unicamente no núcleo, enquanto o RP-B encontra-se distribuído pelo núcleo e pelo citoplasma. Estas duas isoformas geralmente são sintetizadas na mesma proporção.³⁶ O RP-C é específico do útero.³⁷ Os RP têm como função a ativação de proteínas cinases funcionais tal como a via da MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), da CDK2 (do inglês, *cyclin-2 dependent kinase protein*) e da caseína cinase II.^{38,39}

Foi demonstrado que cerca de 50% dos carcinomas que expressam RE também expressam RP. A existência de RP nas células tumorais depende da expressão dos recetores de estrogénio funcionais.³³ Foi também demonstrado que, a nível terapêutico, os tumores RE positivos e RP positivos têm melhor prognóstico que tumores apenas expressam RE.⁴⁰

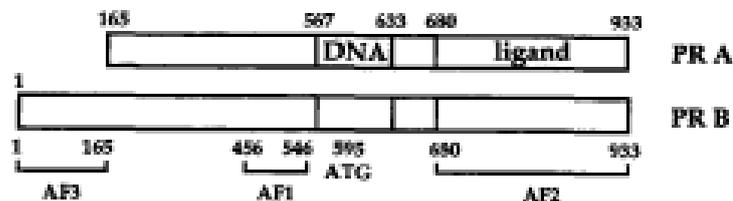


Figura 4: Representação do gene das isoformas do RP. Imagem retirada de Graham *et al.*, 1996.⁴¹

HER-2

O HER-2 é um marcador molecular do cancro da mama, com implicações terapêuticas na prática clínica. Foi verificado em estudos que uma sobreexpressão do HER-2 é um sinal de carcinogénese mamária, tendo também um efeito no crescimento de tumores agressivos e de metástases. Este marcador induz o crescimento de tumores e

promove a invasão através dos seus efeitos a nível das células estaminais normais e malignas.⁴²

O HER-2 foi descoberto em 1985, porém a sua importância e o seu papel na progressão do cancro da mama apenas foi descrita dois anos mais tarde.^{43,44} As células normais apenas apresentam uma cópia do oncogene HER-2, encontrando-se no braço longo do cromossoma 17.⁴⁵ A expressão deste gene vai levar à produção duma proteína transmembranar com atividade tirosina cinase que regula o crescimento celular, com um peso molecular de 185 kDa.⁴⁶ Em cerca de 25% dos cancros da mama encontra-se uma amplificação deste gene de 2 a 20 vezes. Isto vai levar a um aumento dos recetores de HER-2 na superfície das células levando a uma excessiva divisão celular e, consequentemente, à génese tumoral.⁴⁷

O HER-2, também designado por ErbB-2, é um recetor da superfamília dos recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês, *epidermal growth factor receptor*) que, além deste, inclui mais três isoformas, nomeadamente o ErbB-1, o ErbB-3 e o ErbB-4.⁴⁸ Todas estas proteínas são transmembranares com um domínio hidrofóbico, um domínio citoplasmático que tem atividade tirosina cinase, e um domínio extracelular para o ligando. Estes recetores são ativados pela ligação de um fator de crescimento que tem, como consequência, a dimerização dos recetores e a ativação do domínio intracelular cinase que autofosforila os resíduos de tirosina.⁴⁹

Os tumores da mama que têm a sobreexpressão de HER-2 têm uma maior taxa de recidivas e um pior prognóstico, devido às suas características patológicas, tais como o tamanho do tumor, o índice de proliferação e o grau citonuclear.^{50,51,52}

Quando este recetor está presente no tumor a escolha da terapêutica recai na utilização de um anticorpo monoclonal dirigido à proteína, o trastuzumab. Este fármaco foi aprovado em 1998 pela *Food and Drug Administration* (FDA), para tratamento de

metástases, em combinação com o paclitaxel e para monoterapia, em doentes que tenham sido submetidos previamente a quimioterapia.⁴⁵ Foram obtidos melhores resultados na utilização desta terapia como primeira linha de tratamento do que quando foi aplicada após a quimioterapia.^{53,54} Assim em 2006 foi aprovada a utilização de trastuzumab como tratamento de primeira linha com a quimioterapia como tratamento adjuvante⁴⁵. Este anticorpo bloqueia o HER-2 e, assim, inibe a proliferação celular induzida por este recetor. Além disso pode ativar a resposta imunológica promovendo a ligação de células do sistema imunitário a este anticorpo.⁴⁷

Classificação molecular

Considerando os marcadores expostos, atualmente, na prática clínica os cancros da mama são classificados baseando-se na expressão destes marcadores. Assim, surgem três tipos de cancro da mama, isto é, os que expressam recetores hormonais, nomeadamente, RE e RP, os que sobreexpressam HER-2 e os que não expressam nenhum destes marcados e se designam comumente por triplos negativos (TN).

Esta classificação é fundamental para adequar o tipo de tratamento. Assim, para cancros da mama que sobreexpressam o HER-2, tal como referido, o tratamento passa pela utilização do anticorpo monoclonal, o trastuzumab. No caso dos cancros da mama que expressam recetores hormonais, utiliza-se maioritariamente a hormonoterapia. Finalmente, no caso dos tumores triplos negativos, que não expressam nenhum destes marcadores ainda não existe um tipo de tratamento dirigido, estando disponível apenas a quimioterapia convencional.

Os câncros da mama triplos negativos apresentam pior prognóstico. A resistência à terapêutica é frequente, assim como a existência de recidivas e da maior taxa de mortalidade entre os câncros da mama.

Apesar das mais valias prognósticas e terapêuticas desta classificação do câncro da mama, esta estratificação não é linear em todos os doentes, reconhecendo-se que na prática clínica, existem doentes que são subtratados e outros submetidos a terapêutica adjuvante desnecessária.

Assim, têm-se reunido esforços para criar uma classificação molecular do câncro da mama. Com base em estudos de expressão a nível pós-transcricional realizados pela técnica de cDNA *microarray*, iniciados por Sanford e colaboradores foi possível dividir os câncros da mama em vários subtipos.^{55,56,57}

Os grupos que foram criados foram o *basal-like*, o HER-2 positivo, o normal *breast like*, o luminal subtipo A e o luminal subtipo B.^{57,55,56} Esta classificação molecular não está disseminada na prática clínica e está reservada a ensaios clínicos. No entanto, está descrito que esta estratificação permite prever os resultados da terapêutica bem como adequá-la a cada doente, aumentando assim a eficiência do tratamento.

O subtipo luminal A do câncro da mama é o mais comum entre os seis e corresponde a 50-60% dos casos de câncro da mama. O luminal A tem um perfil de expressão caracterizado pela presença de RE, de RP, de BCL-2 e de citoqueratina CK8/18, bem como a ausência de HER-2 e baixo grau histológico. Este subtipo com expressão de RE no epitélio luminal que reveste os ductos mamários e com baixa expressão de genes envolvidos na proliferação celular, constituiu o grupo com melhor prognóstico.

O luminal B à semelhança do luminal A expressa RE, porém tem um fenótipo mais agressivo, alto índice de proliferação, alto grau histológico e pior prognóstico. Por

estes motivos, têm sido feitos esforços no sentido de encontrar um novo marcador que possa distinguir entre estes subtipos, o luminal A e o luminal B. O luminal B expressa frequentemente EGFR. Os tumores do subtipo luminal B são menos frequentes e correspondem a uma pequena fatia dos casos de cancro da mama, de 10 a 20%.

Outro subtipo de carcinoma da mama que também expressa genes EGFR e CK8/18, mas este último em menor quantidade, é o subtipo *basal-like*. O *basal-like* representa de 10 a 20% dos cancros da mama. Habitualmente o *basal-like* expressa genes como a citoqueratina com alto peso molecular, como por exemplo CQ5 e a CQ17, a P-caderina, o CD44, entre outros. Estes genes localizam-se nas células mioepiteliais na mama normal. Este subtipo muitas vezes é confundido com os tumores triplos negativos devido à ausência de RE, de RP e de HER-2.

O normal *breast-like* ainda é muito pouco conhecido. Aquilo que se sabe é que não apresenta nenhum marcador molecular e por isso pode ser considerado como parte dos triplos negativos, não responde a quimioterapia neoadjuvante e é um carcinoma muito raro representando cerca de 5 a 10% de todos os cancros da mama.¹⁰

Células estaminais e cancro da mama

As células estaminais são células que têm a capacidade de se perpetuarem através da autorrenovação e gerar células maduras de um tecido particular através da diferenciação.⁵⁸ São igualmente caracterizadas pela capacidade ilimitada de proliferar, grande plasticidade, podendo dar origem a células idênticas, numa divisão simétrica, ou dar origem a uma célula semelhante à progenitora e a uma outra com características diferentes, numa divisão assimétrica, tal como representado na figura 5.⁵⁹ Devido a estas características as células estaminais têm sido estudadas como o objetivo de

utilização para fins terapêuticos em doenças como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, as doenças musculares degenerativas, a insuficiência hepática e cardíaca e o cancro.

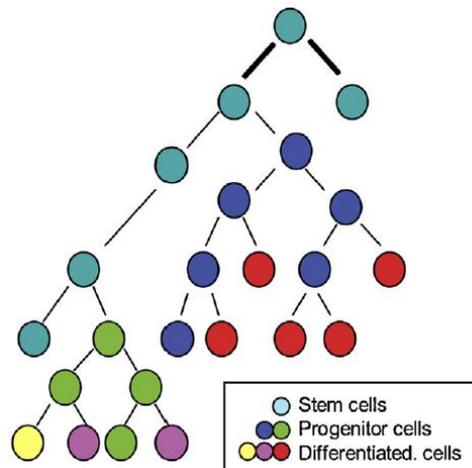


Figura 5: Esquema representativo dos tipos de divisão das células estaminais. Imagem retirada de Yun *et al.*, 2007.⁶⁰

Existem diferentes tipos de células estaminais, as totipotentes, as pluripotentes, as multipotentes e as unipotentes. As células estaminais totipotentes têm o potencial de dar origem a qualquer e a todas as células humanas e podem originar um ser vivo. Esta é uma característica dos gametas e as primeiras divisões celulares no desenvolvimento embrionário produzem mais células totipotentes. Após quatro dias de divisão celular embrionária, as células começam a especializar-se em células estaminais pluripotentes. As células estaminais pluripotentes, podem dar origem a todos os tipos de tecido e/ou órgão mas, ao contrário das anteriores, não podem dar origem a um organismo inteiro. Exemplos deste tipo de células são as que compõem o blastocisto, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme. As células estaminais multipotentes são menos plásticas, mais diferenciadas, e podem dar origem a múltiplos tipos de células dentro de um

determinado órgão. Finalmente, as células unipotentes são as que têm a capacidade de dar origem a um único tipo de tecido.⁶¹

Ao longo dos tempos tem sido reforçada a teoria dos tumores serem organizados numa hierarquia de populações celulares heterogêneas com diferentes propriedades biológicas e que a capacidade de formação e de sustentação dos tumores reside exclusivamente numa porção minoritária de células tumorais denominadas de células estaminais do cancro (CSC) que partilham características com as células estaminais⁶².

A teoria das células estaminais do cancro postula que os tumores incluem CSC, células que são responsáveis pelo início do cancro e do seu desenvolvimento tendo características de células estaminais.⁴⁹ Esta teoria não surge apenas como explicação para a origem do cancro mas também como um possível alvo terapêutico, como representado no esquema da figura 6.

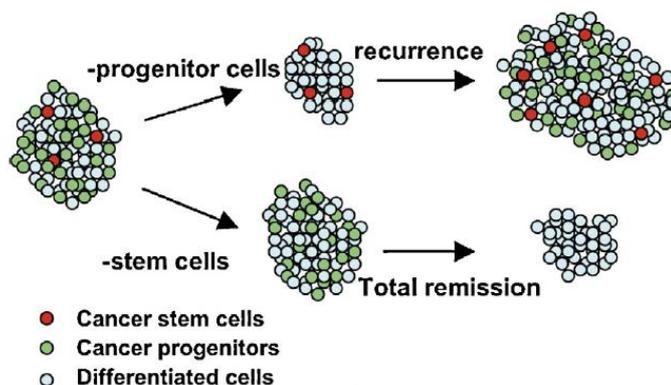


Figura 6: Representação da teoria das células estaminais do cancro e a sua possível importância como alvo terapêutico. Imagem retirada de Yun *et al.*, 2007.⁶⁰

As CSC, que tal como as células estaminais têm a capacidade de renovação e de diferenciação, são resistentes à apoptose. Estas células não sofrem do efeito de envelhecimento uma vez que elas têm um mecanismo de manter o comprimento dos telómeros após uma divisão celular, adquirindo assim a capacidade de replicação

ilimitada⁴⁹. Estas células são responsáveis pela metastização, resistência à terapêutica e pela recidiva tumoral. No cancro da mama, as CSC correspondem a menos de 3% de toda a massa tumoral.⁶³

Assim, tem havido um esforço por parte da comunidade científica no sentido de estudar e de caracterizar estas células, com o propósito de dirigir a terapêutica para elas. Novas terapias dirigidas à eliminação das CSC podem, potencialmente, levar à remissão tumoral.⁶⁴

Os primeiros estudos que surgiram sobre as células estaminais do cancro apontaram à semelhança com as células estaminais normais, no século XXI.^{65,66} Rudolf Virchow sugeria que o cancro era originário da ativação do estado de dormência de células embrionárias que estariam nos tecidos maduros. Esta conclusão foi proveniente das semelhanças entre as células embrionárias e algumas células cancerígenas.⁶¹

Em 1960, foram realizadas as primeiras experiências que confirmaram a existência de células estaminais tumorais.⁶⁵ Em 1997, Bonnet e Dick descreveram uma subpopulação de células imaturas em doentes com leucemia mieloblástica aguda que eram capazes desenvolver tumores em alguns ratinhos com um sistema imunológico comprometido. Estas células foram caracterizadas pela presença de um marcador de superfície específico, o CD34 (CD34⁺) e a ausência do marcador CD38 (CD38⁻). Os autores, no mesmo trabalho, verificaram que estas eram as únicas células com tais capacidades uma vez que realizaram a mesma experiência mas com células que apresentavam um fenótipo CD34⁺/CD38⁺ e estas não foram capazes de iniciar o desenvolvimento de tumores. A descoberta do fenótipo CD34⁺/CD38⁻ na subpopulação de células leucémicas foi a primeira prova da existência de células estaminais tumorais em doenças malignas hematopoiéticas e foi o início de uma extensa pesquisa sobre a presença de CSC em tumores sólidos.⁶⁷

A origem das CSC é controversa. Atualmente existem duas teorias que são suportadas por evidências experimentais. Uma teoria propõe que as CSC resultam da desregulação das vias normais de autorrenovação e de diferenciação das células estaminais, do que resultam células tumorais com capacidade de autorrenovação e de diferenciação. O que suporta esta teoria são as evidências relativas às semelhanças entre as células estaminais normais e as CSC, sendo que as células estaminais são altamente suscetíveis a mutações e a transformações oncogénicas, devido aos seus tempos de vida longos.⁶² Um dos tipos de cancro em que se tem estudado a teoria das CSC é o cancro da mama. Al-Hajj *et al.* (2003) acreditavam que as células estaminais do cancro da mama provavelmente provêm de células progenitoras do tecido mamário, devido às semelhanças entre o perfil da superfície celular das células basais e as putativas células estaminais do cancro da mama que foram descobertas.⁶⁸

A segunda teoria sugere que as células estaminais do cancro da mama se desenvolveram a partir da transição epitelial-mesenquimal (EMT). As células que tenham sido induzidas a realizar a transição epitelial-mesenquimal são suscetíveis à transformação e adquirem muitas características e comportamentos semelhantes a células estaminais normais e neoplásticas.^{69,70}

As células estaminais são raras e para se estudar as suas propriedades os investigadores têm tentado, com pouco sucesso, identificar e purificar estas células. Os estudos *in vitro* têm usado como recurso o isolamento de CSC, através da formação de colónias de esféricas em suspensão, as chamadas mamosferas, que mantêm as características das células estaminais tumorais do cancro da mama, com marcadores CD44⁺/CD24^{-low} e capacidade tumorigénica *in vivo*.⁷¹

Vários trabalhos recentes têm usado o modelo de mamosferas para estudar as CSC. É o caso do trabalho de Gangopadhyay *et al.* (2013) onde os autores descrevem a

importância de investigar as inibições seletivas dos recetores das vias *hedgehog* (Hh), *Notch*, e *Wnt*, para reconhecer potenciais alvos terapêuticos. Beug *et al.* (2009) no seu trabalho também utilizaram como modelos mamíferas para desenvolver uma técnica para identificar pequenas moléculas que inibem, especificamente, a proliferação das células estaminais do cancro da mama a partir da indução de diferenciação.^{72,73}

Um passo marcante para a avaliação de fatores de prognóstico tumoral seria pois a existência de testes para identificação de células estaminais tumorais.⁶⁸ As CSC já foram identificadas, de acordo com marcadores específicos, em tumores hematopoiéticos, de mama, de pulmão, de ovário, de próstata, colorretal e de tumores cerebrais.

Outros marcadores

P53

A proteína P53 foi descrita pela primeira vez em 1979 como uma proteína relacionada com a transformação celular. Com os primeiros estudos do gene desta proteína foi descrita a atividade como oncogene uma vez que a sua expressão em tumores de ratinho e humanos era muito superior do que nas células normais.^{74,75} Mais tarde verificou-se que esta elevada expressão da P53 em células tumorais não era uma expressão real uma vez que a proteína que tinha sido considerada como *wild type* era apenas a proteína mutada com uma mutação *missense*.⁷⁶ Por volta dos anos noventa foi obtido com sucesso o primeiro ratinho que não expressava a P53, sendo um passo importante para a demonstração das propriedades como supressor de tumor.⁷⁷ Em 1992

foi obtida uma descrição da P53 que se mantem até à atualidade por D. Lane⁷⁸ descrevendo esta proteína como “o guardião do genoma”.⁷⁸

A P53, que apresenta a estrutura de uma fosfoproteína, é constituída por 393 aminoácidos e tem um peso molecular de 53 kDa, sendo esta a característica que lhe deu o nome.⁷⁹ Contém onze exões e dez intrões. O seu gene encontra-se no braço curto do cromossoma 17, como está representado na figura 7.⁸⁰ A sua estrutura apresenta vários domínios funcionais, nomeadamente, como o N-terminal, C-terminal, uma região rica em prolinas e um domínio central de ligação ao DNA.^{81,82} Este último domínio é o mais conservado entre as diferentes espécies e entre as diferentes proteínas que pertencem à família da P53.⁸³ É também neste domínio que encontramos as mutações mais frequentes nesta proteína. A região rica em prolinas tem como papel manter a estabilidade da proteína bem como a regulação da *murine double minute 2* (MDM2, do ingles, *murine double minute 2*).⁸⁴ O N-terminal tem uma atividade de transativação e de interação com vários fatores de transcrição e o C-terminal está relacionado com a morte celular. O C-terminal regula negativamente o domínio central de ligação ao DNA^{85,86}. Esta regulação é produzida como um bloqueio do local de ligação proteína-DNA devido à conformação da proteína quando esta se encontra inativa. Este bloqueio é cessado quando a proteína é ativada por uma modificação pós-traducional, como a fosforilação. A fosforilação não é um único processo pós-traducional capaz de modular a P53, podendo esta proteína ser acetilada e ubiquitinada, processos que contribuem para a regulação eficaz do crescimento e da morte celular.⁸⁷

A P53 tem várias funções biológicas, regulando mais de mil proteínas alvo diferentes. Desta maneira a P53 consegue modular vários processos celulares. As consequências biológicas da função da P53 são a regulação do ciclo celular, o desenvolvimento, a diferenciação, a amplificação de genes, a indução de apoptose e a

senescência celular, como representado na figura 8.⁸⁸ Esta proteína é essencial para manter a integridade do genoma quando a célula se encontra em situações de stresse, bem como para prevenir a proliferação celular indesejada.⁸⁹

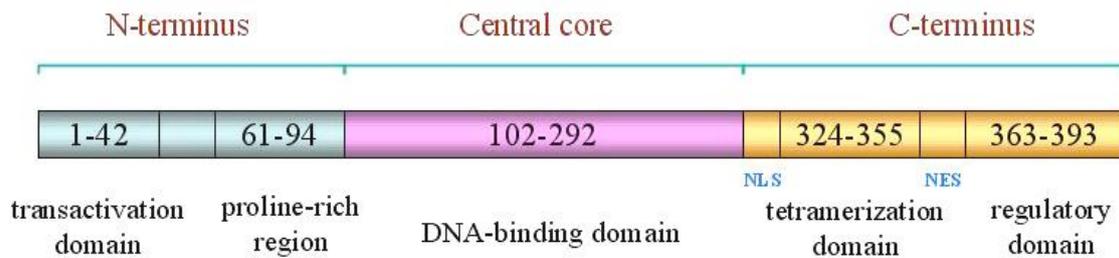


Figura 7: Representação esquemática do gene que codifica a proteína P53. Imagem retirada de Bai *et al.*, 2006.⁹⁰

A P53 pode ser estimulada quando na célula temos danos no DNA que podem ser causados por radiação UV, por radiação ionizante, por fármacos citotóxicos, por agentes de quimioterapia e por infecção por vírus. Pode ser estimulada de igual maneira por efeitos de hipoxia e de expressão de oncogenes. A ativação da proteína vai levar a um aumento da expressão desta no núcleo, por ligação à sequência específica do DNA e, por conseguinte, levar à expressão de certos genes alvo.^{86,91,92}

Em mais de 50% de todos os casos de cancro em humanos a P53 está mutada, e dos restantes, grande parte tem a expressão desta proteína inexistente. Ambas as situações têm a mesma consequência, ou seja, proliferação indesejada das células e a consequente transformação de células normais em malignas.⁸⁶

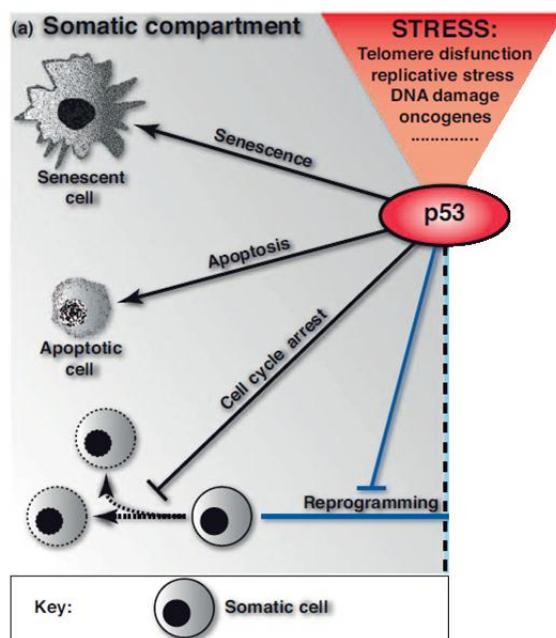


Figura 8: Representação esquemática das funções da P53 quando a célula se encontra em situações de stress. Imagem adaptada de Bonizzi *et al.*, 2012.⁸⁹

Vários estudos mostram que a P53 se encontra envolvida na regulação da homeostasia, bem como no tipo de divisão celular das células estaminais.⁸⁹ A sua inativação ou a perda da sua expressão pode levar ao aumento da autorrenovação e reprogramação das células estaminais. Estes estudos abrem novos horizontes para possíveis novas terapias.⁸⁹

ALDH

A aldeído desidrogenase (ALDH) foi descoberta em 1949 no fígado.⁹³ A ALDH catalisa a oxidação dos aldeídos nos seus respetivos ácidos numa reação quase irreversível. A superfamília da ALDH tem um papel importante na destoxificação enzimática dos aldeídos endógenos e exógenos uma vez que estes podem causar citotoxicidade, mutagénese e carcinogénese das células.⁹⁴

Desde 1949 têm-se descoberto inúmeros tipos de ALDH, sendo distinguidas pelas suas características físico-químicas, pelas propriedades enzimáticas, pela localização celular e pela sua distribuição nos tecidos.⁹⁵ A ALDH tem várias funções tais como a proliferação, a diferenciação celular, a sobrevivência e a resposta ao stresse oxidativo da célula.⁹⁶ O genoma humano contém cerca de dezanove genes funcionais da ALDH. Cinco isoformas funcionais das dezanove, localizam-se na mitocôndria.^{97,98}

As ALDH podem ser classificadas, pela sua constante de Michaelis (Km), em ALDH1 e ALDH2, que pertencem ao grupo com baixo Km, e em ALDH3 e ALDH4, que pertencem ao grupo com elevado Km.⁹⁹

A ALDH 1 é uma proteína citoplasmática que se encontra em vários órgãos como o fígado, o estômago e o cérebro. Tem uma estrutura tetramérica, com um peso molecular de 54 kDa e o seu gene encontra-se no cromossoma 9.¹⁰⁰ A ALDH 2 é uma proteína que se encontra na matriz da mitocôndria e está presente em vários tecidos mas é expressa em maiores quantidades no fígado. É uma proteína tetramérica, com um peso molecular de 50 kDa e o gene que a codifica situa-se no cromossoma 12.¹⁰¹

A expressão ALDH1 tem sido muito estudada pois, devido a uma das funções desta proteína ser a diferenciação, pensa-se que a sua expressão possa ser um bom marcador para distinguir as células normais das células estaminais.¹⁰²

Foi demonstrado por Ginestier *et al.*,(2007) que células humanas normais e tumorais do epitélio mamário, que tinham uma elevada expressão de ALDH, tinham propriedades estaminais. Neste trabalho ainda foi mostrado que uma fração de células do cancro da mama com uma elevada atividade de ALDH tinham a capacidade de se autorrenovarem e capacidade de originarem um novo cancro qual tinha a mesma heterogeneidade do tumor original.¹⁰²

Terapêutica no cancro da mama

A terapêutica de primeira linha para cancros da mama em estadio inicial é a cirurgia. A cirurgia pode ser radical ou conservadora, sendo selecionada de acordo com as características do tumor, nomeadamente o estadiamento, a focalidade, as dimensões e o resultado estético. Na cirurgia conservadora apenas é feita a remoção do tumor e de uma margem de tecido saudável à volta deste.⁴¹ O tratamento conservador inclui, na maioria dos casos, radioterapia (RT) adjuvante, que têm provado que desempenha um papel fundamental na eficácia do tratamento e no intervalo livre de doença.^{103,104,105,106}

Os estudos clínicos mostram que cerca de 30 a 40% dos doentes com cancro da mama metastizado respondem à hormonoterapia.^{57,58} Os fármacos que interagem com os recetores hormonais são os moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERMS), os inibidores da aromatase, os reguladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERDs) e os análogos da *gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH). O tamoxifeno é o modulador mais estudado e a terapêutica dirigida com mais impacto na abordagem terapêutica. Os inibidores da aromatase reduzem os níveis de estrogénios circulantes e são classificados em inibidores esteróides irreversíveis, como é o caso do exemestano e em inibidores não esteróides, como o letrozol e o anastrozol.^{14,107}

O tratamento sistémico do cancro da mama incluiu citostáticos clássicos e novas moléculas dirigidas a alvos moleculares. A aplicação atual da quimioterapia incluiu a terapêutica adjuvante e neoadjuvante e, no contexto de doença avançada, quimioterapia paliativa.¹⁰⁸

A radioterapia é um dos tratamentos mais utilizados no tratamento de cancro. A radioterapia não é uma terapia dirigida ou seletiva, deste modo, é necessário ajustar a dose para que esta radiação afete apenas o tumor e cause os menores danos possíveis

aos tecidos e órgãos próximos. No caso do cancro da mama podem ser utilizados dois tipos de radioterapia, a radioterapia externa ou a radioterapia interna. A radioterapia externa é uma técnica não invasiva que se baseia no fornecimento de um ou vários feixes de raios-X de alta energia tendo como alvo o tumor. Os feixes são apontados para a área onde se encontra o tumor, destruindo as células tumorais e se este tratamento for bem planeado os tecidos à volta serão conservados. Existe também a radioterapia interna que se baseia na implantação de fontes radiativas, de forma permanente ou temporária em contacto direto com o tumor.¹⁰⁹

A radioterapia encontra-se frequentemente associada a intensos e condicionantes efeitos secundários, porém tem sido uma ajuda indispensável no tratamento de quase todos os tumores, seja como terapia adjuvante seja como neoadjuvante. No cancro da mama esta terapia é importante uma vez que reduz a extensão da cirurgia e ajuda a evitar a mastectomia total.¹¹⁰ No contexto do tratamento conservador do cancro da mama, a radioterapia é um adjuvante aplicado na maioria das doentes submetidas a cirurgia conservadora. Este procedimento, quando indicado, demonstrou ter eficácia semelhante à cirurgia radical. A radioterapia pode ainda ser utilizada para ajudar a aliviar sintomas de doentes com metástases, sendo utilizada como terapia paliativa.^{111,108,112}

Ao longo dos tempos esta terapia tem sido melhorada, a partir dos avanços tecnológicos, de novas metodologias para se distribuírem as doses e de um maior conhecimento sobre a área da oncologia e da radiobiologia.¹⁰⁹ A eficácia do efeito da radioterapia é medida pela razão entre os danos obtidos no tumor e os danos provocados nos tecidos saudáveis adjacentes. Por isso é essencial o estudo dos parâmetros biológicos tais como a cinética da proliferação celular, a hipoxia tumoral, a radiosensibilidade intrínseca das células e a quantidade de células estaminais do cancro

presentes. Estes fatores são importantes para se perceber a resposta das células tumorais à radiação utilizada.¹¹³

OBJETIVOS

Este trabalho pretende avaliar diversas perspectivas considerando as células tumorais da mama que expressam recetores hormonais e as células tumorais da mama triplas negativas.

Translacionando para a prática clínica, os cancros da mama hormonodependentes apresentam uma evolução mais indolente, com terapêutica dirigida disponível, a hormonoterapia adjuvante. Pelo contrário, os cancros da mama triplos negativos não possuem terapêuticas dirigidas e, apesar de apresentarem boas taxas de resposta patológica à quimioterapia convencional, têm recidivas precoces evoluindo para maior resistência às terapêuticas.

Tendo em conta a importância das CSC na progressão tumoral, a resistência à terapêutica e a consequente recidiva, constituiu o principal objetivo deste trabalho o isolamento de CSC de cancros da mama e obtenção de populações derivadas, com vista à sua caracterização molecular, tendo em conta o fenótipo da linha celular que lhes deu origem.

Além disto, pretendeu-se avaliar a resposta à terapêutica das linhas celulares alvo de estudo, focando na radioterapia, uma das terapêuticas primordiais em adjuvante e neoadjuvante do cancro da mama, de modo a comparar o perfil de resposta de células que expressam recetores hormonais com células triplas negativas.

**MATERIAIS E
MÉTODOS**

Cultura de células

Para este estudo utilizaram-se duas linhas celulares humanas de cancro da mama, anteriormente obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC). A linha celular MCF7 é comumente utilizada em estudos relacionados com o cancro da mama. Esta linha expressa os recetores hormonais, nomeadamente RE e RP, mantendo várias das características do epitélio mamário.^{114,115,116} A linha celular HCC1806 foi estabelecida a partir de um carcinoma escamoso acantolítico, de estadia TNM IIB, grau 2. Esta linha celular é característica do cancro da mama triplo negativo.^{114,117} Estas linhas foram propagadas em cultura aderente numa incubadora HeraCell 150 com uma atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C. Para cada linha foi utilizado o meio apropriado de acordo com a recomendação do fornecedor. Assim, para a linha celular MCF7 utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma D-5648, E.U.A.) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*; sigma F-7524, E.U.A.), 100mM de piruvato de sódio (GIBCO 11360, U.K.), e 1% de solução antibiótica e antimicótica composta por penicilina, streptomomicina e anfotericina B (GIBCO 15240, U.K.). Para a linha celular HCC1806 utilizou-se o meio de cultura *Rooswell Park Memorial Institute* (RPMI – 1640; sigma R – 4130, E.U.A.), suplementado com 5% de FBS, 400mM de piruvato de sódio e 1% de solução antibiótica e antimicótica composta por penicilina, streptomomicina e anfotericina B (GIBCO 15240, U.K.).

O perfil molecular distinto das duas linhas celulares a nível da expressão de recetores membranares está representado na tabela 1.

Tabela 1: Perfil de expressão de recetores hormonais.^{114,118;119}

	MCF7	HCC1806
RE	+	-
RP	+	-
Her-2	+	-

Ambas as linhas celulares foram mantidas em condições aderentes. Para a realização dos vários estudos foi necessário destacar as células dos frascos e preparar as suspensões celulares. Para isso as culturas de células foram lavadas com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) constituída por 137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 1,8mM de KH₂PO₄ a pH de 7,4 e incubadas com 2mL de uma solução de tripsina com EDTA a 0,25% (GIBCO 25200, U.K.) durante cerca de cinco minutos à temperatura de 37°C para que ocorra a separação celular. Posteriormente e com o objetivo de inativar o efeito da tripsina adicionam-se 5mL de meio de cultura da respetiva linha celular, centrifugando-se a suspensão celular a 200G durante 5 minutos (*Heracus Multifuge 1L-R*). Após a centrifugação o *pellet* foi suspenso num volume conhecido de meio de cultura.

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada antes da realização das experiências utilizando o método de exclusão do azul de tripano. Este método distingue as células vivas, não coradas, das células mortas que ficam coradas de azul. As células que possuem a membrana celular comprometida permitem a entrada do corante ficando coradas de azul, o que significa que são não viáveis. As células vivas, por seu lado, são

capazes de seletivamente regular a permeabilidade membranar, pelo que estas células têm a capacidade de excluir o azul de tripano do seu interior mantendo-se brancas ou brilhantes.

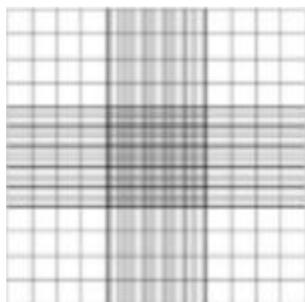


Figura 9: Esquema dos quatro campos do hemocitômetro ou câmara de Neubauer.

A contagem das células realizou-se utilizando um hemocitômetro ou câmara de *Neubauer*, figura 9, e um microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100) com ampliação de 100x. Volumes iguais de suspensão celular e de solução de azul de tripano 0,002% em PBS foram homogeneizados e transferidos para o hemocitômetro. Contaram-se as células no microscópio nos quatro quadrantes dos cantos do hemocitômetro. A percentagem de células viáveis é determinada com a seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100$$

Caracterização imunocitoquímica

As linhas celulares HCC1806 e MCF7 foram caracterizadas morfológicamente por citoquímica e também por imunocitoquímica de modo a avaliar a expressão da

proteína P53, proteína associada à carcinogénese anteriormente descrita, e do Ki67, um marcador da proliferação celular.

Para tal, foram preparadas suspensões celulares que foram centrifugadas a 1300rpm durante 3 minutos na centrífuga *Shandon Cytospin II Cytocentrifuge*, que permite a obtenção de lâminas com células dispersas. Posteriormente as lâminas foram coradas para com hematoxilina e eosina (H&E) e com a coloração de papanicolau.

O restante material foi posteriormente centrifugado de modo a obter um *pellet* de cada uma das linhas celulares, numa *Heraeus Sepatech Labofuge Ae Centrifuge* a 1500rpm durante 5min, para inclusão em parafina, permitindo assim o seguimento da técnica de imunocitoquímica, realizada numa *Ventana Marker Platform Bench Mark ULTRA IHC/ISH*.

A análise imunohistoquímica foi realizada em seções de parafina fixadas em formalina. Foi utilizada a técnica do complexo avidina-biotina peroxidase. O anticorpo utilizado para avaliar a P53 foi o p53 DO-7 com uma diluição de 1:50 (DAKO). O anticorpo utilizado para avaliar o Ki67 foi o MIB-1 com uma diluição de 1:50 (DAKO).

As amostras foram observadas num microscópio de luz, *Nikon Eclipse 50i*, e as imagens foram obtidas pela câmara *Nikon-Digital Sight DS-Fi1*.

A expressão da P53 foi classificada de acordo com a escala da Tabela 2. A expressão de Ki67 foi avaliada pela percentagem de expressão.

Tabela 2: Relação entre os valores e percentagens de expressão da P53

Valor	Percentagem
0	Sem expressão
1	1 a 25%
2	26 a 50%
3	51 a 75%
4	76 a 100%

Isolamento de células estaminais do cancro

Têm sido propostas várias técnicas para isolar potenciais células estaminais do cancro da mama, incluindo a cultura de células em condições não aderentes e não diferenciantes para formar colónias de células esféricas em suspensão designadas por mamosferas.^{62,120}

A formação de mamosferas foi descrita por Dontu (2003)¹²¹ e Mani (2008)⁶⁹ e o procedimento que se pretende utilizar neste estudo está de acordo com o destes autores com ligeiras modificações, que serão expostas de seguida.

As linhas celulares foram mantidas em condições não aderentes em frascos de cultura de baixa aderência (TC-flasche, Sarsted, E.U.A.), previamente revestidos com uma solução de poli-hema, em meio de cultura DMEM-F12 (D8900; Sigma, E.U.A.) sem FBS durante cinco dias, de modo a adquirir características de indiferenciação. O meio de cultura DMEM-F12 utilizado foi suplementado com putrescina (Sigma PS780, E.U.A.), 1% de insulina/transferrina/selenium-A (GIBCO 51300, E.U.A.), 1% solução antibiótica composta por penicilina, streptomomicina e anfotericina B(GIBCO 15240, U.K.) e 1% de metilcelulose (Sigma M7027, E.U.A.), de forma a obter uma solução viscosa que impede a agregação celular. Posteriormente, de dois em dois dias após o início do protocolo, foram adicionados ao meio 10ng/mL de factor de crescimento endotelial (EGF, do inglês *endotelial growth factor*; Sigma, E94, E.U.A.), e 10ng/mL de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*; Sigma, F0291,E.U.A.).

Assim, as mamosferas obtidas através das linhas celulares, MCF7 e HCC1806, após o processo descrito foram designadas de MCF7-MS1 e HCC1806-MS1, prospectivamente. Após este procedimento as MCF7-MS1 e HCC1806-MS1 foram

cultivadas em condições de cultura *standard* como descrito anteriormente, no meio de cultura recomendado para cada linha celular, suplementado com 5% de FBS, sendo passadas a designar-se de MCF7-G1 e HCC1806-G1. Quando as culturas atingiram 85 a 90% de confluência as células foram submetidas de novo ao protocolo de formação de mamíferas de forma a obter a segunda geração de mamíferas, pelo que se passaram a designar por MCF7-MS2 e por HCC1806-MS2, prospectivamente. Estas foram de novo cultivadas em condições de cultura *standard* em meio suplementado com 5% de FBS e as células obtidas foram designadas por MCF7-G2 e HCC1806-G2. O procedimento foi repetido uma última vez de modo a obter as mamíferas finais MCF7-MS3 e HCC1806-MS3 que posteriormente deram origem às MCF7-G3 e às HCC1806-G3. As culturas celulares MCF7-MS1, MCF7-MS2, MCF7-MS3, HCC1806-MS1, HCC1806-MS2, HCC1806-MS3, MCF7-G1, MCF7-G2, MCF7-G3, HCC1806-G1, HCC1806-G2 e HCC1806-G3 foram usadas para os estudos de *western blot* descritos de seguida.

Western blot

Para verificar a expressão da ALDH, da P53, de RE- α , de RE- β , de RP, e de HER-2 recorreu-se à técnica de *western blot* que permite detetar proteínas específicas numa determinada amostra homogeneizada de tecido ou, como neste caso, de extrato celular.

Esta técnica separa as proteínas da amostra por eletroforese em gel, que pode ser feita através do seu ponto isoelétrico, do peso molecular, da carga elétrica ou uma combinação destes fatores. Contudo, o tipo mais comum de eletroforese em gel usado emprega géis de poliacrilamida e soluções desnaturantes com dodecil sulfato de sódio (SDS) de forma a separar as proteínas nativas ou desnaturadas pelo comprimento do polipeptídeo, isto é, o SDS é um detergente que confere carga negativa às proteínas

permitindo a sua separação mediante o seu peso molecular através do eletródio positivo do gel de poliacrilamida. Quando uma diferença de potencial é aplicada ao longo do gel, as proteínas migram ao longo deste a diferentes velocidades. As proteínas de menores dimensões migram mais rápido através do gel, pelo que migram para o fundo do gel, enquanto as proteínas de dimensões maiores migram mais lentamente ficando no topo do gel. As proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou de difluoreto de polivinilideno (PVDF), onde foram analisadas e detetadas, utilizando anticorpos específicos para a proteína alvo. Durante esta etapa, o anticorpo primário foi introduzido na amostra, com o objetivo de marcar as proteínas com antigénios. Uma vez marcadas as proteínas, estas podem ser facilmente identificadas, com recurso a um anticorpo secundário que se vai ligar especificamente ao anticorpo primário. O *western blot* raramente apresenta falsos positivos. Esta técnica foi utilizada para determinar a expressão das proteínas ALDH, de P53, dos recetores de estrogénio α e β , do recetor de progesterona, e de Her-2.

Para realizar os estudos foram preparados extratos celulares das células MCF7, HCC1806, MCF7-MS1, MCF7-MS2, MCF7-MS3, HCC1806-MS1, HCC1806-MS2, HCC1806-MS3, MCF7-G1, MCF7-G2, MCF7-G3, HCC1806-G1, HCC1806-G2 e HCC1806-G3.

Para a obtenção dos extratos totais de proteína, as células foram lavadas gentilmente com PBS por três vezes e homogeneizadas em solução RIPA (tampão de radioimunoprecipitação) suplementado com *complete mini (cOmplete, Mini, EASYpack, 30 Tab, Roche, Canadá)* e DTT na concentração de 1mM e colocou-se o conteúdo num microtubo *ependorf*[®]. Após agitação em vórtex, as amostras foram submetidas a sonicação com uma amplitude de 35% (*Sonicador VibraCell, modelo VC50 Sonic and Materials inc. USA*) três vezes durante 10 segundos cada. Posteriormente, as amostras

foram centrifugadas durante 15 minutos a 14000G, à temperatura de 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos *ependorf*[®] que foram guardados a -80°C. Todo este processo se realizou mantendo o material biológico em contacto com gelo para manter uma temperatura baixa.

Para a determinação da quantidade de proteína foi utilizado o método de BCA (BCA[™] *protein assay kit*, Pierce). De seguida as amostras foram descongeladas e homogeneizadas por vórtex e desnaturadas à temperatura de 100°C durante 5 minutos, após solubilização em solução desnaturante constituída por 100mM de tris, 100mM de glicina, SDS a 4%, 8mM de ureia e azul bromofenol a 0,01%).

Para a realização da eletroforese polimerizaram-se os géis de acrilamida que foram colocados no sistema de corrida com tampão apropriado composto por 25mM de tris, 192 mM de glicerina a pH 8.3 e SDS (Bio-Rad 161-0772) e procedeu-se à disposição das amostras e do padrão de pesos moleculares (*NZYColour Protein Marker II*, nzytech). Depois de terminada a eletroforese, os géis foram colocados em contacto direto com as membranas de PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno; Bio-Rad, EUA) previamente ativadas em metanol. O sistema de transferência foi preparado e a reação ocorreu a uma diferença de potencial de 100V, em tampão CAPS na concentração de 100mM, e de pH de 11 (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*) (Sigma C233362500). Terminada a transferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de TBST-BSA a 5% (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) (Acros Organics code:233362500), à temperatura ambiente. Cerca de 1 hora depois, incubaram-se as membranas, durante a noite, à temperatura de 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários adequados.

Para a deteção da ALDH utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-ALDH ½ H-8 preparado em ratinho (SC-166362, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou uma

banda de 55 kDa. Para a deteção da P53 utilizou-se o anticorpo anti-p53 DO-7 preparado em ratinho (SC-7698, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou a banda de 53 kDa. Para a deteção do recetor de estrogénio α utilizou-se o anticorpo monoclonal anti- recetor de estrogénio α preparado em ratinho (ab1104, abcam®), que detetou a banda de 68 kDa. Para a deteção do recetor de estrogénio β nos extratos da linha celular HCC1806 utilizou-se o anticorpo policlonal anti- recetor de estrogénio β X-24 preparado em coelho (SC-133554, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou a banda de 56 kDa. Para a deteção do recetor de estrogénio β nos extractos da linha celular MCF7 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti- recetor de estrogénio β B-1 preparado em coelho (SC-390243, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), que detetou a banda de 56 kDa. Para a deteção do recetor de progesterona utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-recetor de progesterona SP2 preparado em coelho (ab27161, abcam®), que detetou duas bandas a de 95 kDa e a de 120 kDa. Para a deteção do HER-2 utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-Erb2 3B5 preparado em ratinho (ab16901, abcam®) que detetou a banda de 190 kDa.

No dia seguinte, efetuaram-se lavagens, com TBS-T a 1%, e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário apropriado, sob agitação constante e à temperatura ambiente, durante cerca de 1 hora. Depois deste período de tempo, as lavagens foram repetidas, como mencionado. As membranas foram, depois, incubadas com substrato enzimático (*ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente cinco minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

Para normalizar os resultados do *western blot*, realizaram-se dois procedimentos. Para as proteínas ALDH, P53 e RH voltaram-se a incubar as membranas com um anticorpo anti- β -actina. A actina é uma proteína que se encontra em todas as células. Ao

quantificar esta proteína obtivemos a quantidade que se encontra na amostra em análise. A actina tem um peso de 48 kDa. Porém para a proteína HER-2 as condições de corrida da eletroforese não proporcionam a retenção desta proteína no gel, por isso recorreu-se à técnica de ponceau. Esta técnica consiste em corar a membrana antes do bloqueio e adquirir uma imagem que permite normalizar a quantidade de proteína.

Dependendo do peso molecular da proteína tivemos de adequar as condições da técnica de forma a obter os melhores resultados possíveis. Os parâmetros que foram sujeitos a otimização foram, a percentagem de acrilamida no gel utilizado para a eletroforese, o tempo e a diferença de potencial a que a eletroforese foi realizada e o tempo que demorou a transferência. Para a P53, ALDH, RE α e β foram utilizadas as mesmas condições uma vez que os seus pesos moleculares são similares. Assim foram utilizados géis de acrilamida a 10%, com uma eletroforese com dois passos em que primeiro passo foi realizado com uma diferença de potencial de 80V durante vinte minutos e o segundo passo com uma diferença de potencial de 160V durante uma hora e vinte e cinco minutos. A transferência por sua vez decorreu durante uma hora com a diferença de potencial de 100V. Para o RP foram utilizados géis de acrilamida a 10%, com uma eletroforese com dois passos, o primeiro dos quais com uma diferença de potencial de 100V durante cinco minutos e o segundo passo com uma diferença de potencial de 150V durante uma hora e trinta minutos. A transferência, por sua vez, decorreu durante uma hora e meia. Para o HER-2 foram utilizados géis de acrilamida a 8%, com a eletroforese com dois passos em que primeiro foi realizado com uma diferença de potencial de 100V durante cinco minutos e o segundo passo com uma diferença de potencial de 150V durante uma hora e quarenta e cinco minutos. A transferência por sua vez decorreu durante uma hora e meia.

Resposta à radioterapia

Para avaliar e comparar a ação da radioterapia nas duas linhas celulares de adenocarcinoma da mama, as MCF7 e as HCC1806, as culturas celulares foram sujeitas a diferentes doses de radiação de 0, de 2, de 4, de 6, de 8 e de 10 Gy.

Prepararam-se suspensões celulares das linhas celulares em estudo numa concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL, com o volume necessário para realizar as experiências pretendidas. As suspensões foram transferidas para microtubos *eppendorf*[®] consoante a quantidade necessária para cada condição. Foi preciso ter em atenção o facto de o volume de suspensão celular perfazer o volume máximo do microtubo, de modo a não conter ar aquando da irradiação. Foram realizados controlos em todos os ensaios, ou seja, células que passaram por todos os passos da experiência excetuando a irradiação. Para obter uma irradiação com dose homogénea em todo o volume e de modo reprodutível e fiável, foi utilizada uma caixa de irradiação em acrílico com paredes de 1 cm de espessura, com dimensões e referências para posicionamento gravadas em relevo e em tudo compatíveis com as condições habituais de operação do acelerador linear para as quais foi utilizado, especialmente desenhada. Assim, foi possível garantir condições de posicionamento e de acondicionamento reprodutíveis, bem como a homogeneidade da dose administrada. Esta caixa foi construída no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, e foi igualmente utilizada em tomografia computadorizada (TC) de modo a realizar estudos de dosimetria. As dimensões da caixa de irradiação e do campo de irradiação (40cm × 40cm) e a distância da fonte dos feixes ao centro da caixa permite calcular o tempo necessário para haver a administração da dose pretendida. Este tempo é medido em unidades de monitor (UM, do inglês *Monitor Units*). A figura 10 mostra

nos estudos de TC para o planeamento tridimensional, bem como o perfil de dose de radiação administrado. O acelerador linear utilizado para a irradiação foi um acelerador *Varian Clinac 600C* (Varian, California, EUA), com raios-X de 4MV, utilizado na rotina clínica de tratamento de radioterapia externa¹²². O procedimento de irradiação foi executado por um Engenheiro Físico com formação adequada. Para iniciar a sessão de irradiação colocou-se a caixa de irradiação vazia sobre o tampo da mesa de tratamento e distribuíram-se os microtubos *ependorf*[®] com as diferentes linhas celulares, preparados previamente para as várias doses de radiação, mantendo os respetivos controlos fora da sala. Para assegurar a homogeneidade de dose recebida pelas células, os microtubos *ependorf*[®] foram submersos em água, à temperatura de 37°C, com a caixa de irradiação posicionada com o seu eixo longitudinal paralelo ao eixo central do feixe. Preparada a caixa com as amostras iniciou-se a sessão de tratamento. Assim, a dose foi administrada em duas fases, a primeira fase consistiu na irradiação com a gantry a 90° e a segunda fase na irradiação com a gantry a 270°, perfazendo assim a dose pretendida. Após estas duas irradiações retiraram-se da caixa os microtubos *ependorf*[®] com a condição irradiada, permanecendo os restantes, e assim sucessivamente. Para finalizar, retiram-se os últimos microtubos *ependorf*[®] da caixa de irradiação, retirando também toda a água que a preenchia.

Os microtubos *ependorf*[®] foram submetidos a doses únicas de 2, de 4, de 6, de 8 e de 10 Gy de Raios-X, à exceção dos controlos.

De modo a avaliar a resposta celular à radioterapia realizou-se o ensaio clonogénico, um teste de viabilidade celular geralmente utilizado para avaliar os efeitos da radiação. Este ensaio avalia a sobrevivência pela capacidade de proliferação celular e pela capacidade das células formarem colónias, sendo possível avaliar o resultado da

agressão celular induzida pela radiação uma vez que são quantificadas as células que permanecem viáveis e são capazes de originar colônias.

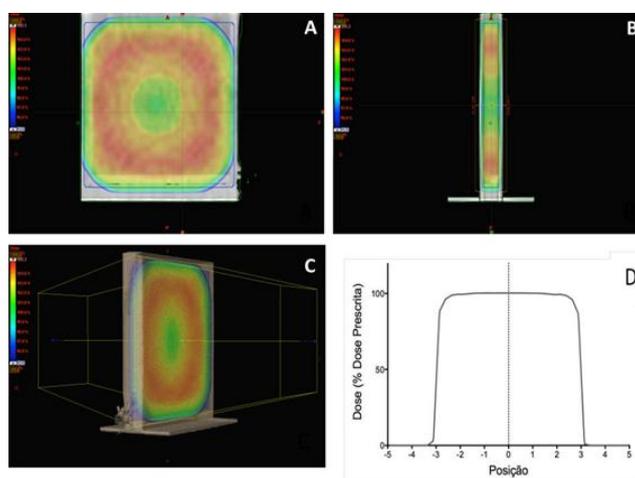


Figura 10: Planeamento realizado para irradiação das células: (A) representação frontal, (B) representação lateral e (C) representação tridimensional da caixa de irradiação. A distribuição de dose encontra-se representada pela escala de cor, variando de um mínimo de 95% (azul) a um máximo de 105,3% (vermelho); (D) perfil de dose administrada ao longo da espessura da caixa.

Após a irradiação plaqueou-se o número pretendido de células de cada linha celular em placas (*Starstedt AG & Co*, Alemanha, Nümbrecht) de 6 poços, perfazendo cada poço como respetivo meio até 3 mL e incubaram-se à temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, tal como indica a figura 11.

Ao quinto dia de incubação mudou-se o meio de cada poço das placas e por fim ao décimo segundo dia efetuou-se a cloração com violeta de cristal. Para corar as colónias descartou-se o meio das placas, lavando de seguida com PBS e adicionaram-se cerca de 2mL de metanol (32213, *Sigma-Aldrich*®, St. Louis, EUA), durante dez minutos, para permitir que as colónias se fixassem. De seguida descartou-se o metanol e adicionou-se o corante violeta cristal a 0,5% diluído em metanol deixando atuar cinco minutos. Após este tempo aspirou-se o corante e lavaram-se as placas em água tépida, agitando levemente.

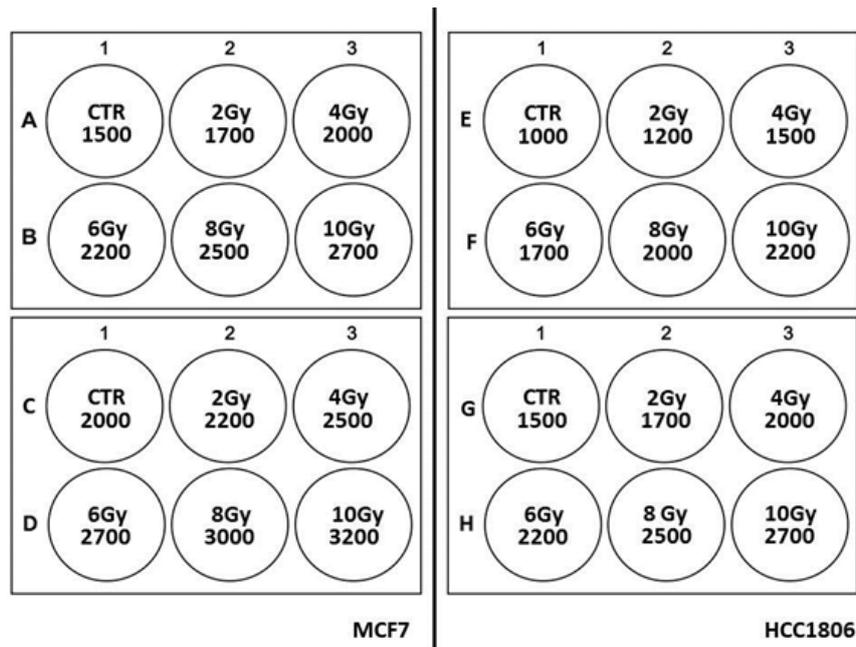


Figura 11: Esquema representativo do semear das células nas placas de 6 poços de acordo com a dose a que foram irradiadas.

Deixaram-se as placas secar totalmente e procedeu-se à contagem das colónias para, desta forma se poder calcular a *eficiência da placa (EP)* e o *fator de sobrevivência (FS)* pelas seguintes equações respetivamente:

$$\text{Eficiência da placa (EP)} = \frac{\text{número de colónias}}{\text{número de células plaquedas}}$$

$$\text{Factor de sobrevivência (FS)} = \frac{\text{eficiência da placa das células tratadas}}{\text{eficiência da placa com células controlo}} \times 100 (\%)$$

Após se obterem os resultados, foi possível desenhar uma curva de sobrevivência celular, relacionando o FS e a dose de radiação administrada. Assim foi possível avaliar a resposta de cada linha celular às diferentes doses de irradiação administrada.

Os resultados experimentais relativos aos ensaios clonogénicos foram ajustados a um modelo linear-quadrático para a obtenção de curvas dose-resposta, utilizando o *software* OriginPro versão 8.0, segundo a equação:

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

onde D representa a dose em Gy e α e β correspondem aos parâmetros do modelo. Porém quando o β é de valor igual a zero os dados adquam-se melhor a um modelo se um só alvo e um só toque, sendo caracterizado por uma curva de sobrevivência exponencial em que o cálculo da sobrevivência é feito com a equação a seguir apresentada:

$$SF = e^{-\frac{D}{D_0}}$$

onde D_0 representa a dose letal média.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM® SPSS®, versão 20.0. A análise descritiva de variáveis quantitativas foi feita com recurso a medidas de tendência central, de dispersão e de localização. Para a realização de análise comparativa, foi inicialmente testada a normalidade dos valores quantitativos utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

A comparação dos valores obtidos nas condições testadas por *Western Blot* com o controlo foi realizada utilizando o teste t de Student para uma média corrigido por Bonferroni, considerando o valor de normalização 1,

A comparação dos fatores de sobrevivência e da percentagem de células em proliferação entre linhas celulares ou condições experimentais foi realizada com recurso ao teste ANOVA de um fator (teste paramétrico, utilizado em condições de normalidade

da distribuição e homogeneidade de variâncias) ou ao teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico, utilizado nos restantes casos). Utilizou-se a correção de Bonferroni nas comparações múltiplas.

A análise comparativa dos fatores de sobrevivência e da proliferação celular com o controlo foi feita utilizando o teste t de *Student* para uma média, comparando os valores obtidos com o valor 1, com correção de Bonferroni.

Considerou-se um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

RESULTADOS

Citoquímica e imunocitoquímica

A imunocitoquímica é uma técnica que consiste na análise de uma amostra de células com a aplicação de anticorpos específicos para os componentes que se pretendem observar com a coloração. Esta técnica é vantajosa porque permite para além da identificação os componentes que se encontram nas células, avaliar a sua localização na célula, nuclear ou citoplasmática e, assim, perceber a função na qual poderão estar envolvidas.¹²³ Esta técnica, ao longo do tempo, tem sido utilizada em vários estudos do cancro da mama para a classificação dos diferentes tipos e sua estratificação clínica.^{124,125}

Realizou-se a imunocitoquímica nas duas linhas celulares que se encontram em estudo neste trabalho, a linha celular MCF7, que está descrita como característica de cancro da mama que expressa recetores hormonais e a linha celular HCC1806, linha com características de cancro da mama triplo negativo.

Através da coloração com hematoxilina e eosina (H&E) convencional e em *cell block* e da coloração de papanicolau da linha celular HCC1806 observaram-se células com grande variabilidade na forma e no tamanho, algumas delas multinucleadas, com aumento da relação núcleo/citoplasma, de contornos nucleares irregulares e pleomorfismo nuclear de moderado a severo, com núcleos hipercromáticos ou de cromatina aberta e múltiplos nucléolos proeminentes. Observaram-se ainda células com fenótipo em anel de sinete, evidenciando-se também índice mitótico elevado, como se pode observar nas imagens da figura 12.

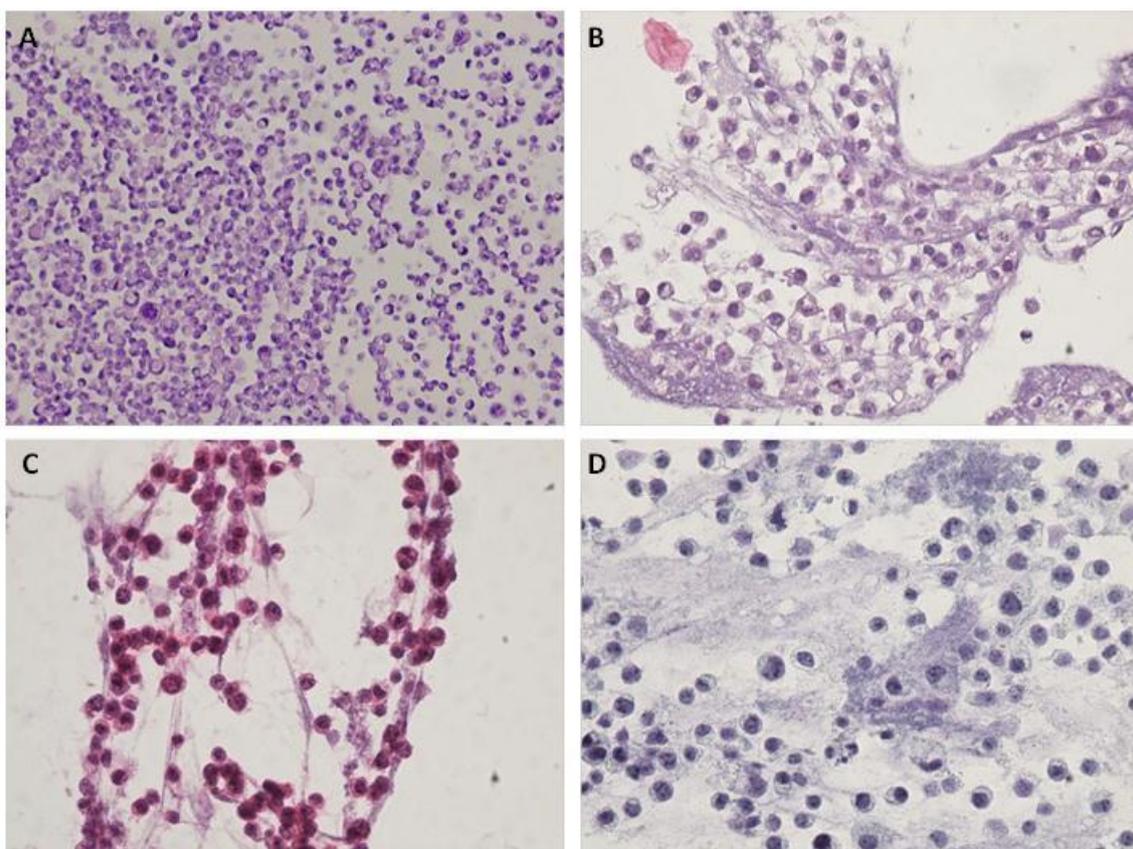


Figura 12: Imagens de citoquímica das células HCC1806. A: coloração de H&E, 200x. B e C: coloração de H&E em *cell block*, 400x. D: coloração de papanicolau, 400x.

As células da linha celular MCF7 submetidas à coloração de H&E e de papanicolau estão representadas na figura 13. Estas células apresentaram grande variabilidade na forma e no tamanho, com aumento da relação núcleo/citoplasma, contornos nucleares irregulares e pleomorfismo nuclear de moderado a severo, com núcleos de cromatina aberta e atividade nucleolar evidente. Verificou-se também que o índice mitótico destas células era elevado.

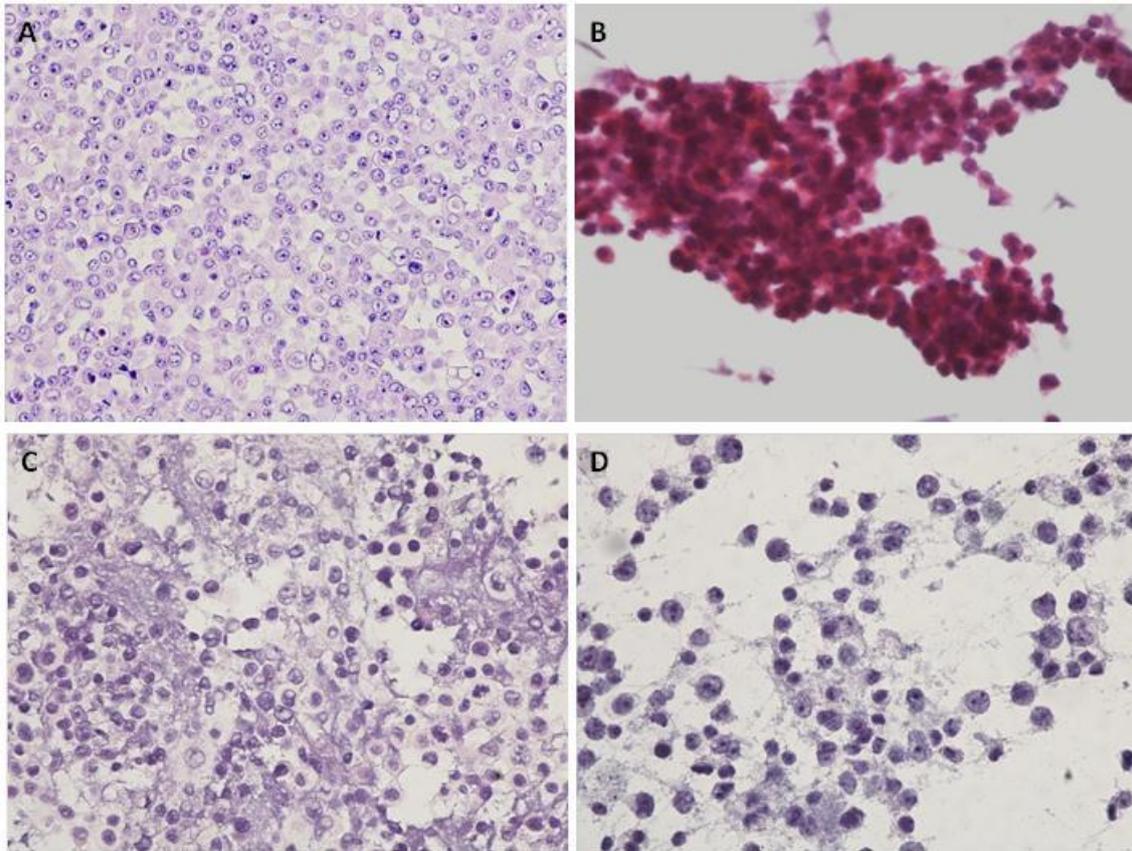


Figura 13: Imagens de citoquímica das células MCF7. A: coloração de H&E, 200x. B: coloração de H&E em *cell block*, 400x. C: coloração de papanicolau, 200x. D: coloração de papanicolau, 200x.

Para além das colorações para a visualização da morfologia e para caracterização das diferentes linhas celulares foi avaliada a presença do marcador Ki-67, importante indicador da proliferação celular. A imunomarcação com Ki67 na linha celular HCC1806, que se pode observar na figura 14-A foi positiva de forma intensa e difusa a nível nuclear em cerca de 80-90% das células.

Relativamente à imunomarcação com Ki67 da linha celular MCF7 esta também foi positiva de forma intensa e difusa a nível nuclear em cerca de 70 a 80% das células, como se pode observar na figura 14-B.

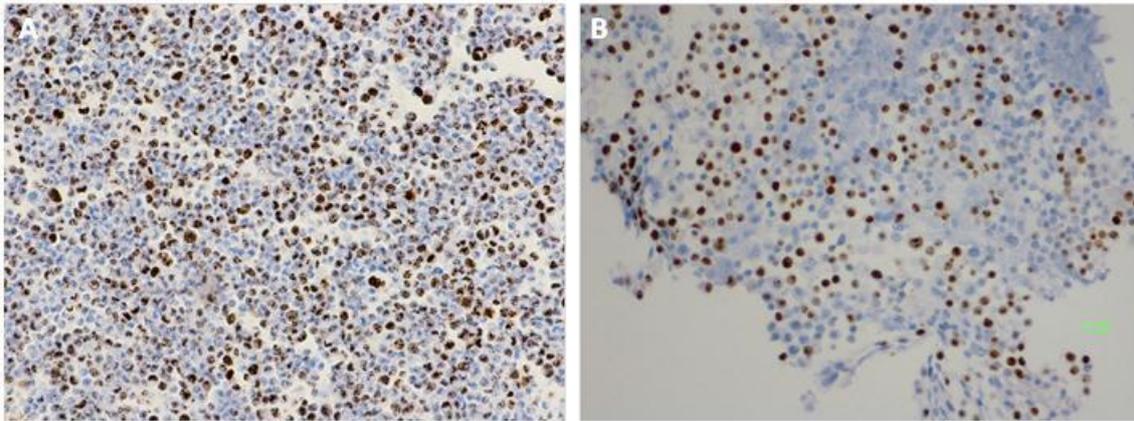


Figura 14: Imagens de imunocitoquímica para o marcador de proliferação Ki-67. A: células HCC1806, 200x. B: células MCF7, 200x.

Avaliou-se também a expressão da proteína P53 nas linhas celulares HCC1806 e MCF7 como representado na figura 15. A imunomarcação com P53 nas células HCC1806 revelou ausência de marcação nuclear como se pode observar na figura 15-A. Enquanto a imunomarcação com P53 nas células da linha MCF7 revelou marcação nuclear intensa e difusa em cerca de 90% das células como se pode observar na figura 15-B.

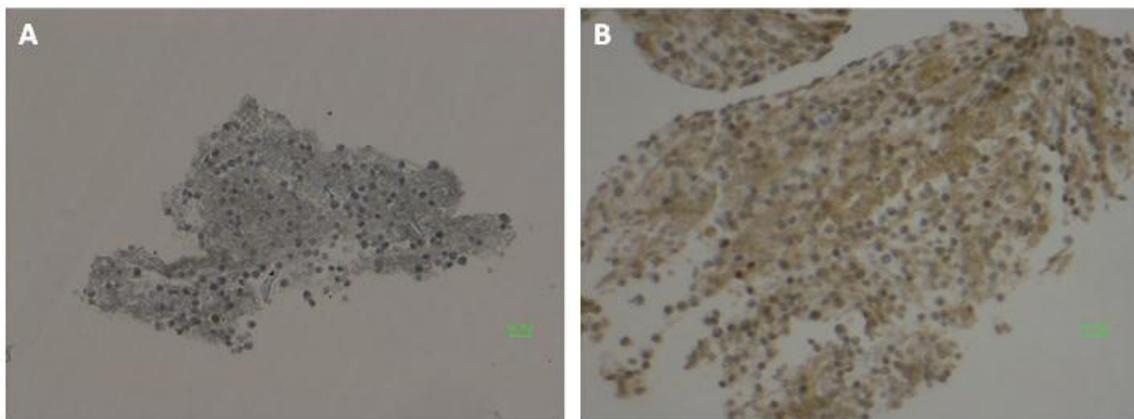


Figura 15: Imagens de imunocitoquímica para a marcação para a proteína P53. A: células HCC1806, 200x. B: células MCF7, 200x.

Tendo em conta a estratificação clínica do cancro da mama pretendeu-se também avaliar a expressão dos recetores hormonais de estrogénio α e de progesterona nas

linhas celulares alvo deste estudo. Assim, na figura 16 está representada a marcação para o RE- α . Como se pode observar na figura 16-A as células HCC1806 revelaram negatividade para a imunomarcação do recetor de estrogénio. Em contraste, na figura 16-B pode observar-se que a imunomarcação para estes recetores na linha celular MCF7 revelou positividade nuclear intensa e difusa em cerca de 80-90% das células.

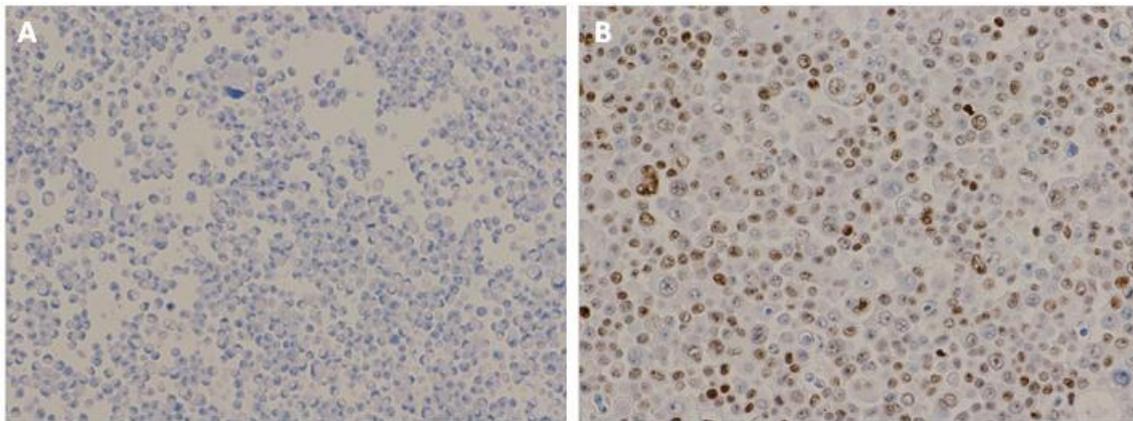


Figura 16: Imagens de imunocitoquímica para a marcação do RE- α . A: células HCC1806, 200x. B: células MCF7, 200x.

No que concerne ao recetor de progesterona a expressão está representada na figura 17. As células HCC1806 também revelaram negatividade para a imunomarcação deste recetor, o que se pode apreciar na figura 17-A. As células MCF7 são positivas para o recetor de progesterona, sendo que a imunomarcação para os recetores de progesterona revelou positividade nuclear intensa e difusa em cerca de 50% das células, como se pode constatar na figura 17-B.

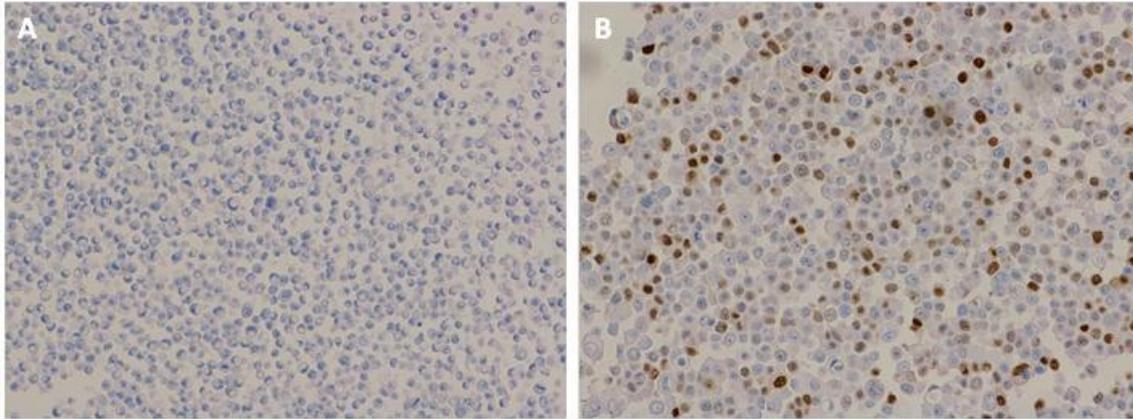


Figura 17: Imagens de imunocitoquímica para a marcação do receptor de progesterona. A: células HCC1806, 200x. B: células MCF7, 200x.

Isolamento de CSC

As duas linhas celulares de cancro da mama em estudo, as MCF7 e as HCC1806, foram submetidas ao protocolo de formação de mamosferas como descrito e foi possível obter todas as gerações de CSC denominadas sequencialmente por MS1, MS2 e MS3 e as gerações derivadas das anteriores denominadas por G1, G2 e G3. Todas as gerações não aderentes, as MS1, as MS2 e as MS3, representam colónias esféricas em suspensão de morfologia idêntica. A figura 18 mostra as imagens de microscopia ótica das células MCF7 (figura 18-A) e das células HCC1806 (figura 18-B, bem como as CSC MS1 obtidas a partir de cada uma das linhas celulares, a figura 18-C para as MCF7-MS1 e a figura 18-D para as HCC1806-MS1.

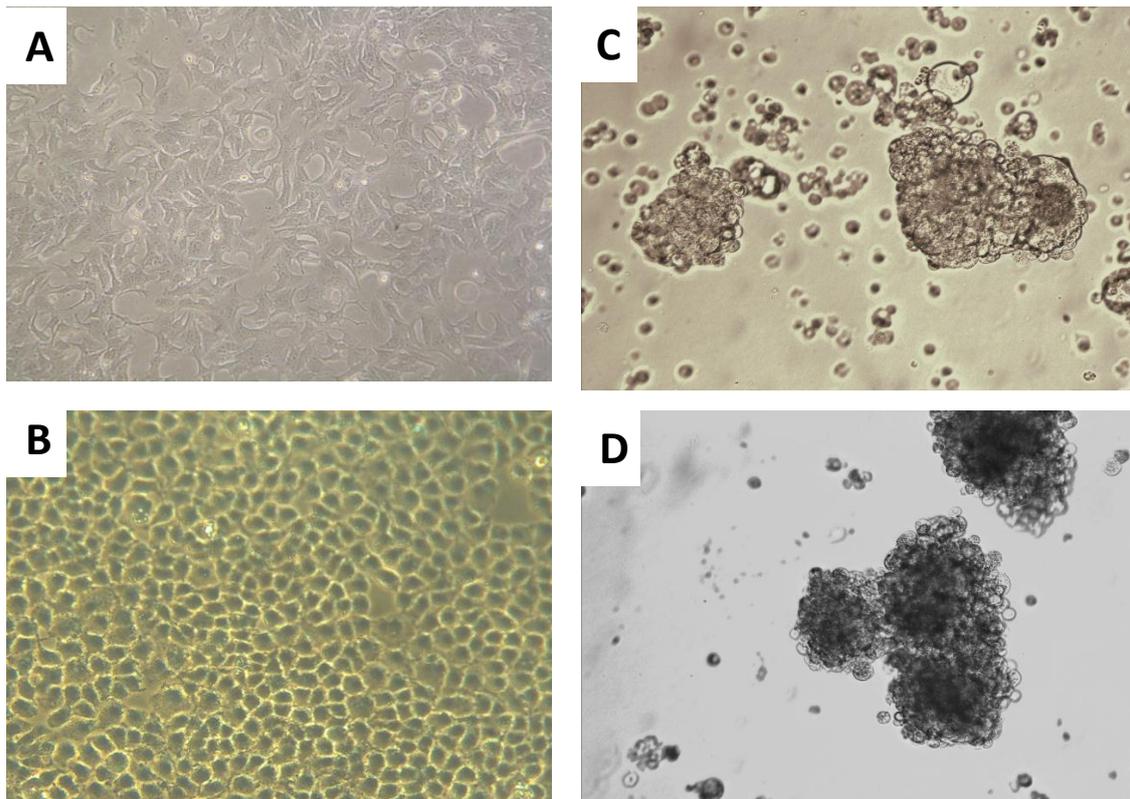


Figura 18: Imagem das linhas celulares e das respectivas mamosferas MS1. A: células da linha celular MCF7, 100x. B: células da linha celular HCC1806, 100x. C: CSC MCF7-MS1, 100x. D: CSC HCC1806-MS1, 100x.

Expressão de proteínas em CSC

A avaliação da expressão das proteínas descritas de seguida foi realizada nas linhas celulares de origem, as MCF7 e as HCC1806 bem como nas populações celulares suas derivadas, nomeadamente, as populações de mamosferas das várias gerações como as MCF7-MS1, as MCF7-MS2, as MCF7-MS3, e as respetivas células derivadas como as MCF7-G1, as MCF7-G2, as MCF7-G3 referentes à linha celular MCF7. Em relação à linha HCC1806, os estudos realizaram-se sobre as mesmas populações, as HCC1806-MS1, as HCC1806-MS2 e as HCC1806-MS3 no caso das várias gerações de

mamosferas e as HCC1806-G1, as HCC1806-G2 e as HCC1806-G3 referentes às respectivas células derivadas.

A aldeído desidrogenase (ALDH) pertence à família das oxiredutases que é responsável pela catalisação dos aldeídos em ácidos. A expressão aumentada desta proteína verificou-se ser um marcador relevante de células estaminais. Existem várias isoformas desta proteína, sendo a mais relevante, no contexto das células estaminais do cancro (CSC) da mama, a isoforma ALDH 1. Pensa-se que esta proteína pode estar envolvida no início do processo de diferenciação das CSC.¹²⁶ O gene da ALDH 1 encontra-se no cromossoma 9, tem uma estrutura tetramétrica com um peso molecular de 54 kDa.¹²⁷ A ALDH 2 tem um peso molecular de 56 kDa.

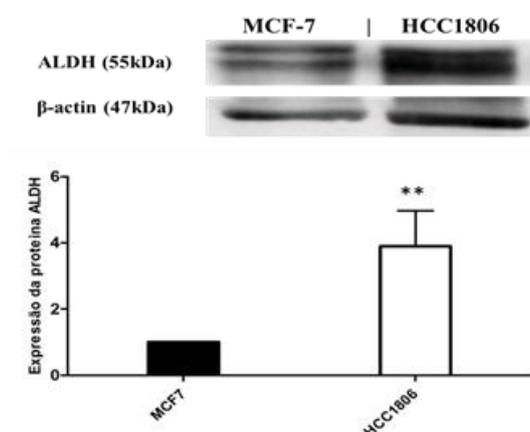


Figura 19: Expressão da ALDH, nas células MCF7 e nas células HCC1806. Os resultados representam a razão entre a expressão da ALDH e da β-actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 3 experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Neste trabalho foi possível comparar a expressão da ALDH entre as duas linhas celulares, a linha celular MCF7 e a linha celular HCC1806, e verificou-se que existe uma maior expressão desta proteína nas células HCC1806, sendo este aumento três

vezes superior à expressão nas células MCF7, com significado estatístico ($p=0,004$), como se encontra demonstrado na figura 19.

Após se ter verificado que ambas as linhas celulares expressam esta proteína procedeu-se à avaliação das populações obtidas a partir destas células. Nas mamóferas derivadas de MCF7 verificou-se um aumento, com significância estatística, da expressão da ALDH em todas as gerações comparativamente com as células MCF7 de origem, sendo que para as MCF7-MS1 se obteve um $p=0,006$, para as MCF7-MS2 se obteve um $p=0,042$ e para as MCF7-MS3 se obteve um $p=0,024$. Foi possível verificar que em todas as gerações aderentes derivadas das mamóferas não houve diferenças de expressão relativamente à linha celular MCF7 de origem (figura 20).

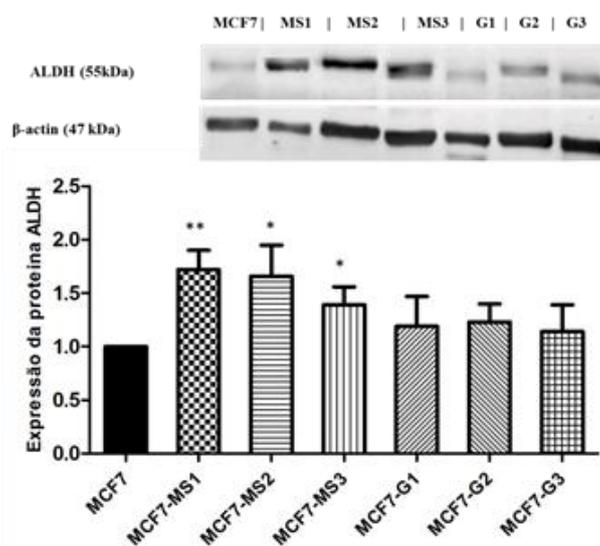


Figura 20: Expressão da ALDH nas células da linha MCF7 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão da ALDH e da β -actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 5 experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$.

Nas populações obtidas a partir da linha celular HCC1806, observaram-se resultados semelhantes aos anteriores, como se pode comprovar na figura 21. Existe um

aumento da expressão da proteína ALDH nas mamíferas, com significado estatístico em relação à linha celular HCC1806 de origem, nomeadamente, nas mamíferas HCC1806-MS1 com $p < 0,001$, nas mamíferas HCC1806-MS2 com $p = 0,036$ e nas mamíferas HCC1806-MS3 com $p = 0,006$. Na figura 21 pode ainda apreciar-se que as populações celulares com fenótipo aderente derivadas das mamíferas, expressam níveis da proteína ALDH idênticos à linha celular HCC1806 de origem.

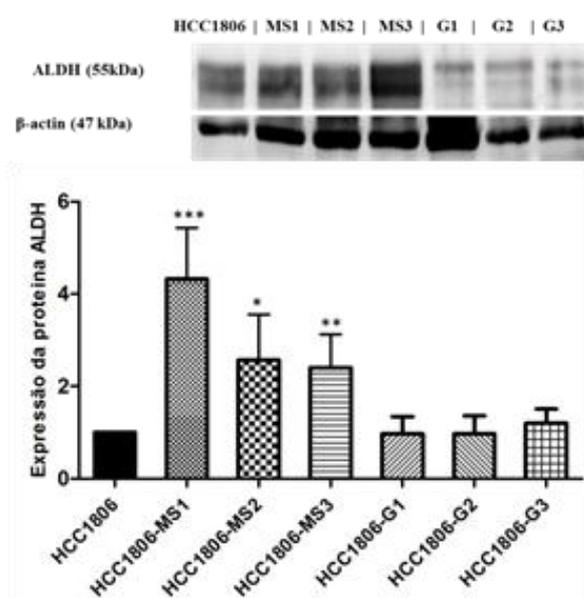


Figura 21: Expressão da ALDH nas células da linha HCC1806 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão da ALDH e da β -actina, normalizados para a linha celular HCC1806. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 7 experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

A proteína P53, conhecida como o “guardião do genoma”, encontra-se envolvida em várias funções na célula tal como a regulação do ciclo celular, a indução da morte por apoptose, a senescência celular e a recombinação de DNA. A ausência da expressão da P53 ou a sua mutação na maioria das vezes encontra-se associada à carcinogénese.

Esta proteína contém 393 aminoácidos, contendo três domínios funcionais, sendo o seu peso molecular de 53 kDa.⁹⁰

A análise por *western blot* confirmou a ausência de expressão da P53 na linha celular HCC1806 e nas populações celulares derivadas desta linha celular também não se detetou proteína nas referidas condições experimentais. A figura 22 mostra um imunoblot representativo destes resultados em que se utilizou a linha celular MCF7 como controlo positivo.

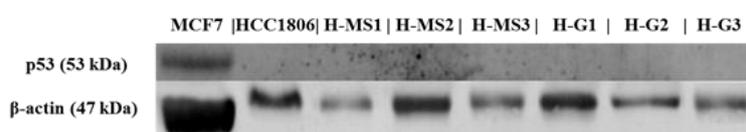


Figura 22: Imunoblot representativo da expressão da P53 nas células da linha HCC1806 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3.

Pode-se observar uma diminuição de expressão da P53 nas mamosferas derivadas da linha celular MCF7, com resultados estatisticamente significativos para as mamosferas MCF7-MS1 com $p=0,018$ quando comparada com as células de origem. Na população aderente derivada das mamosferas pode-se observar uma expressão semelhante à expressão de P53 nas células MCF7 de origem como se encontra representado na figura 23.

Até agora foram identificados e estudados dois tipos de recetores de estrogénio, a isoforma α e a isoforma β . Estes recetores no cancro da mama têm um importante papel no crescimento e na progressão do tumor. Ambos têm uma estrutura muito similar diferindo apenas num domínio. O RE- α contém 595 aminoácidos, sendo o seu peso molecular de 66 kDa. O RE- β contém 530 aminoácidos, sendo o seu peso molecular de 55 kDa.²³

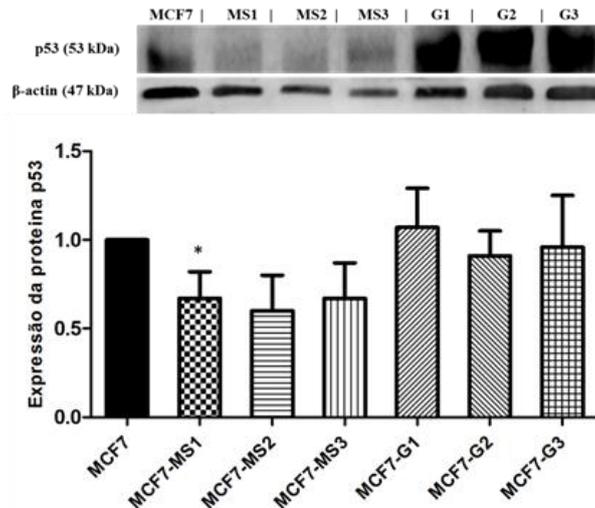


Figura 23: Expressão da P53 nas células da linha MCF7 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão da P53 e da β -actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 4 pelo menos experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Ao avaliar a expressão do recetor de estrogénio- α nas células da linha MCF7 e da linha HCC1806 observou-se ausência de expressão desta proteína nas células HCC1806 e nas suas derivadas, aderentes e em suspensão, tal como é visível na figura 24. Na mesma imagem podemos ver uma banda corresponde à expressão deste recetor na linha celular MCF7, o que constituiu um controlo positivo da experiência.

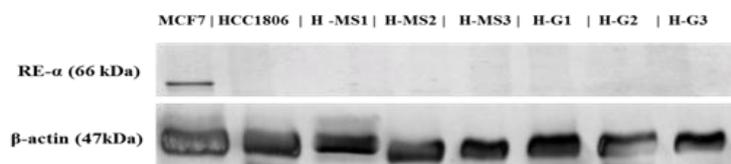


Figura 24: Imunoblot representativo da expressão da RE- α nas células da linha HCC1806 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3.

Na linha celular MCF7 foram realizados estudos em todas as populações celulares e comparadas as populações não aderentes observou-se uma diminuição da expressão do RE- α , com resultados estatisticamente significativos, para as mamíferas MCF7-MS1

em que $p < 0,001$, para as mamosferas MCF7-MS2 em que $p < 0,001$ e para as mamosferas MCF7-MS3 em que $p < 0,001$. As duas primeiras gerações das populações de células aderentes derivadas das mamosferas MCF7-G1 e MCF7-G2, em comparação com a linha MCF7 de origem têm uma expressão similar do RE- α . Porém a última geração aderente derivada das mamosferas, a MCF7-G3 tem um aumento de expressão com, significância estatística ($p = 0,012$), tal como a evidenciado na figura 25.

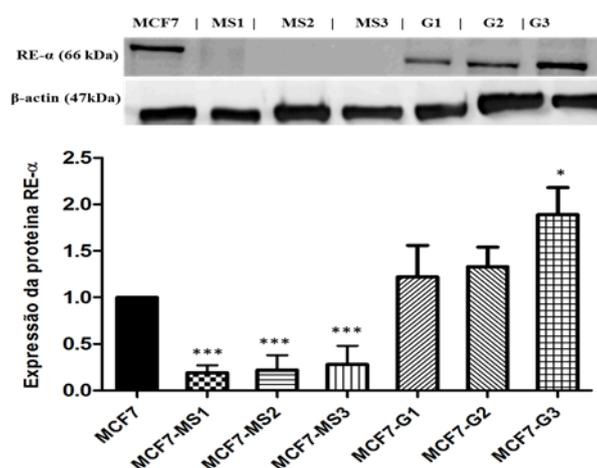


Figura 25: Expressão do RE- α em MCF7 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão do RE- α e da β -actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 4 pelo menos experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

No estudo do RE- β foi, à semelhança dos anteriores, avaliada a sua expressão nas células da linha MCF7 e da linha HCC1806. Foi constatado que a expressão desta proteína nas duas linhas celulares tem uma tendência para ser similar, tal como mostra a figura 26.

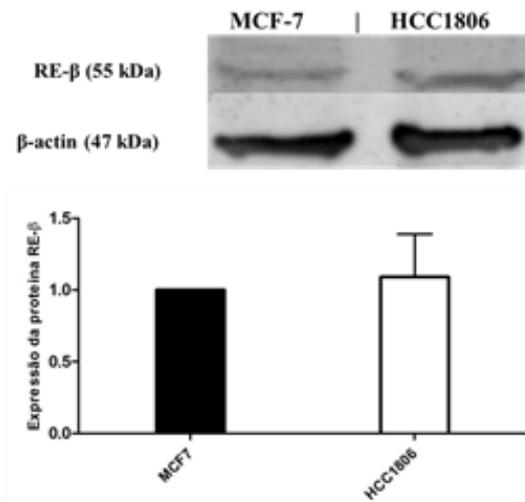


Figura 26: Expressão do RE-β nas células da linha MCF7 e da linha HCC1806. Os resultados representam a razão entre a expressão do RE-β e da β-actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 6 experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

Nas populações celulares derivadas da linha celular MCF7 observou-se uma diminuição da expressão do RE-β nas várias gerações de mamóferas comparativamente à linha celular que lhes deu origem, nomeadamente, para as mamóferas MCF7-MS1 em que $p = 0,006$, para as mamóferas MCF7-MS2 em que $p = 0,018$ enquanto nas mamóferas MCF7-MS3 se verifica uma tendência semelhante mas sem significado estatístico. Por outro lado, as gerações derivadas do fenótipo aderente apresentaram uma expressão idêntica à linha celular original, como se pode observar na figura 27.

Observou-se que a expressão do RE-β na linha celular HCC1806 apresentava uma diminuição nas gerações de mamóferas comparativamente à sua linha de origem com significância estatística para as três gerações, nomeadamente, para as mamóferas HCC1806-MS1 em que $p = 0,012$, para as mamóferas HCC1806-MS2 em que $p < 0,001$ e para as mamóferas HCC1806-MS3 em que $p < 0,001$. Na comparação da linha de origem com as suas derivadas aderentes observou-se uma expressão, sem diferenças da linha celular HCC1806, como é demonstrado na figura 28.

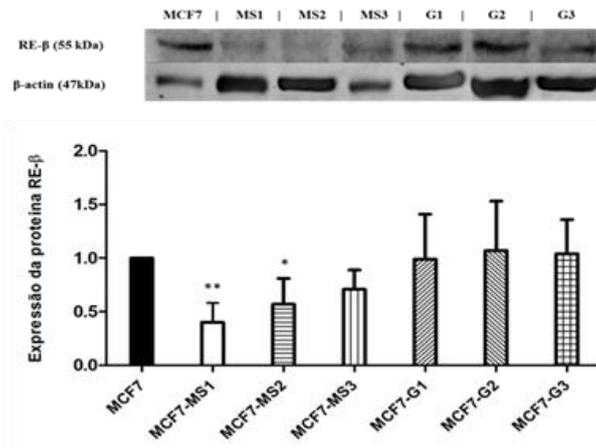


Figura 27: Expressão do RE- β nas células da linha MCF7 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão do RE- β e da β -actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 5 pelo menos experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

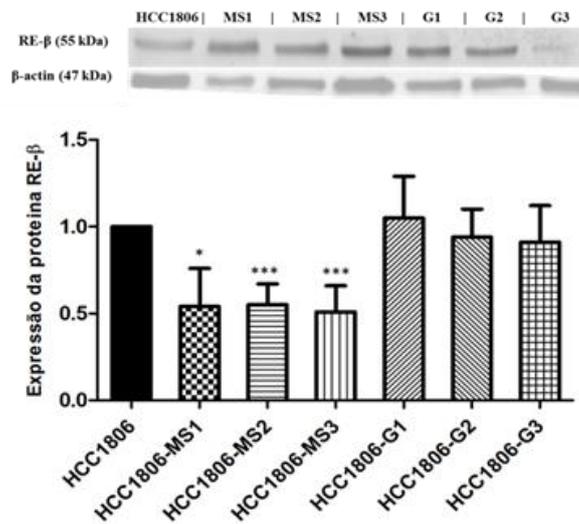


Figura 28: Expressão do RE- β nas células da linha HCC1806 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão do RE- β e da β -actina, normalizados para a linha celular HCC1806. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 6 pelo menos experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

O recetor de progesterona (RP) faz parte da superfamília dos recetores nucleares, à semelhança dos recetores de estrogénio. A ativação daquele recetor pode levar à maturação do epitélio da mama bem como pode auxiliar ao crescimento tumoral. Este recetor tem duas isoformas, a isoforma A com um peso molecular de 99 kDa e a isoforma B com um peso molecular de 82 kDa.¹²⁸

Para a linha celular HCC1806 não foi detetada expressão quantificável deste recetor hormonal, como é possível observar na figura 29.



Figura 29: Imunoblot representativo da expressão da RP nas células da linha HCC1806 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3.

Relativamente à expressão de RP obteve-se, uma diminuição da sua expressão, com significância estatística nas para mamosferas MCF7-MS1 em que $p < 0,001$, para as mamosferas MCF7-MS2 em que $p < 0,001$ e para as mamosferas MCF7-MS3 em que $p = 0,006$. As populações aderentes derivadas de mamosferas MCF7 têm uma expressão semelhante à linha de origem, como é representado na figura 30.

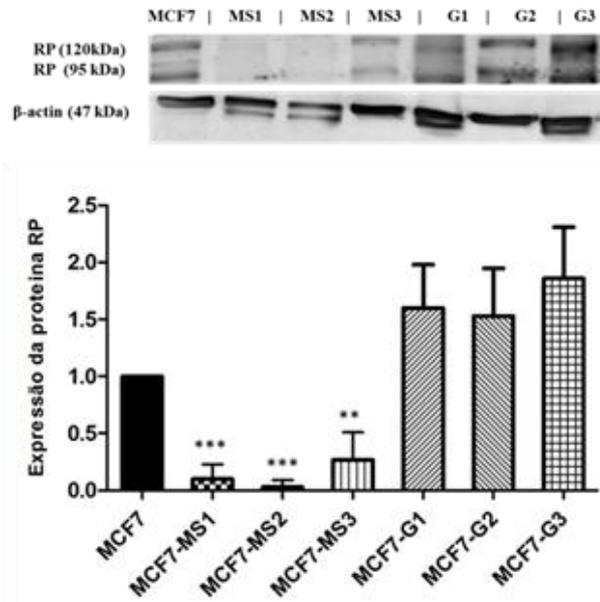


Figura 30: Expressão do RP nas células da linha MCF7 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão do RP e da β -actina, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 4 pelo menos experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$.

O HER-2 é um marcador molecular do cancro da mama, com implicações terapêuticas na prática clínica, descrito em 1985 e que se encontra no braço longo do cromossoma 17. Tem um peso molecular de 185 kDa. No estudo do HER-2 não foi observada expressão na linha celular HCC1806 como está demonstrado na figura 31.



Figura 31: Imunoblot representativo da expressão da RE- α nas células da linha HCC1806 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3.

Na linha celular MCF7 verificou-se uma diminuição da expressão deste recetor, com significância estatística nas mamosferas MCF7-MS1 em que $p = 0,036$, nas

mamosferas MCF7-MS2 em que $p=0,006$ e nas mamosferas MCF7-MS3 em que $p=0,036$. As populações aderentes derivadas de mamosferas MCF7 têm uma expressão semelhante à linha de origem, como é representado na figura 32.

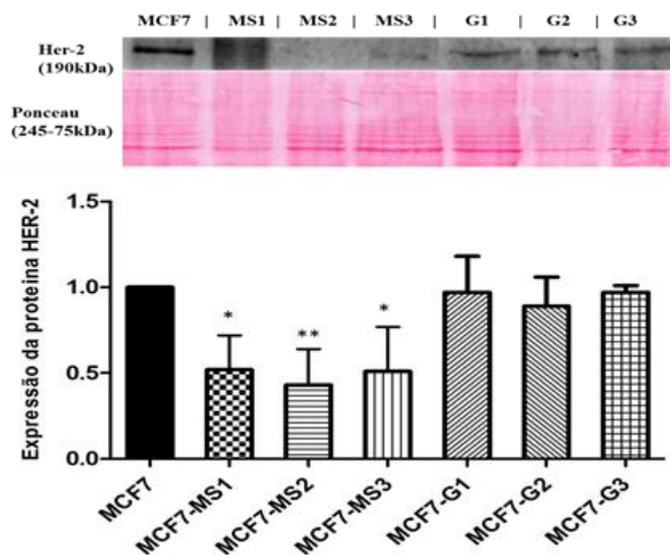


Figura 32: Expressão do HER-2 nas células da linha MCF7 e suas populações derivadas MS1, MS2 e MS3, G1, G2 e G3. Os resultados representam a razão entre a expressão do HER-2 e do Ponceau, normalizados para a linha celular MCF7. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 5 pelo menos experiências. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo estão assinaladas com * em que * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$.

Resposta à radioterapia

Para avaliação da resposta à radioterapia foram utilizadas as linhas celulares HCC1806 e MCF7 e foram comparados os resultados. Perante os resultados dos ensaios clonogénicos calculou-se o fator de sobrevivência (FS) para cada dose de radiação. Seguidamente, no sentido de obter uma curva dose-resposta, os dados obtidos foram ajustados ao modelo mais adequado (figura 33).

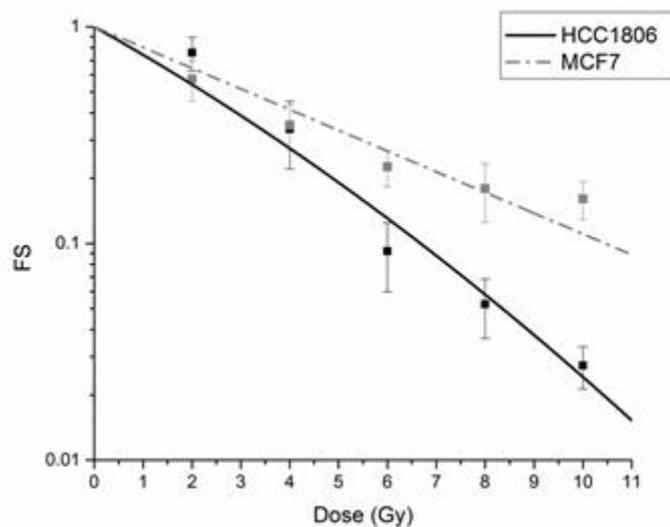


Figura 33: Curva de dose-resposta à radiação para as nas células das linhas MCF7 e HCC1806, obtidas com ensaio clonogénico. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 6 experiências.

O modelo que melhor se adequa aos dados experimentais obtidos com a linha MCF7 é o modelo de um só alvo e um só toque, uma vez que se obtém um valor nulo para β quando aplicado o modelo linear-quadrático. Para esta linha celular foi obtido um valor D_0 (dose letal média) de $4,54 \pm 0,35 \text{Gy}$.

Para a linha celular HCC1806, o modelo mais indicado para obter a curva dose-resposta é o modelo linear-quadrático. Por este modelo foi possível obtermos o valor de β de $0,008 \pm 0,011 \text{Gy}^{-2}$ e o valor de α , $0,290 \pm 0,099 \text{Gy}^{-1}$. Assim a razão entre estes dois parâmetros, α/β , é de $35,32 \text{Gy}$.

A dose que reduz a sobrevivência para 50%, DL_{50} , foi também obtida para as duas linhas celulares, com um valor de $3,148 \text{Gy}$ (intervalo de confiança a 95% [1,11;3,78]) para as células MCF7 e de $2,247 \text{Gy}$ (intervalo de confiança a 95% [2,57;3,91]) para as células HCC1806.

Comparando as duas linhas celulares, verificamos que as células da linha MCF7 apresentam um FS significativamente inferior às células da linha HCC1806 para as doses de 6, de 8 e de 10Gy ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Este trabalho centra-se na comparação de dois tipos de cancro da mama, o cancro da mama que expressa recetores hormonais e o cancro da mama triplo negativo. Pretendeu-se contribuir para o esclarecimento do perfil molecular deste tipo de cancro da mama, particularmente, no que concerne a populações com propriedades de CSC *in vitro*.

O cancro da mama que expressa recetores hormonais, neste trabalho, foi representado pela linha celular MCF7, amplamente descrita na literatura e utilizada como modelo de vários estudos sobre o cancro da mama.^{129,130,131} Na prática clínica, as doentes com este tipo de cancro têm uma menor resposta patológica completa à quimioterapia sendo a hormonoterapia uma terapia adjuvante dirigida disponível.

O cancro da mama triplo negativo foi representado pela linha celular HCC1806 caracterizada como um cancro da mama pouco diferenciado.¹¹⁷ Este tipo de cancro tem um mau prognóstico devido à falta de terapias dirigidas, à sua agressividade e à capacidade de formar metástases e recidivas precoces. Porém este grupo de tumores é mais sensível à radioterapia e à quimioterapia.

Numa fase inicial e de modo a confirmar esta estratificação foram realizados estudos de imunocitoquímica. As células MCF7 caracterizaram-se por apresentarem elevado índice de proliferação, elevada expressão do recetor de estrogénio e expressão do recetor de progesterona. As células HCC1806 caracterizaram-se por uma maior indiferenciação e ausência de expressão dos recetores de estrogénio e de progesterona. Morfológicamente ambas as linhas celulares apresentaram uma grande variabilidade na forma e no tamanho celular com aumento da relação núcleo/citoplasma, contornos nucleares irregulares e pleomorfismo nuclear. Ambas as linhas celulares apresentaram índice mitótico elevado. Porém, as células triplas negativas HCC1806 apresentaram

ainda células multinucleadas, com núcleos hipercromáticos e com atividade nucleolar evidente, características habitualmente associadas a elevada malignidade.

Ao longo das últimas décadas, as CSC têm sido alvo de vários estudos para melhor compreensão do seu papel na carcinogénese e no desenvolvimento dos tumores.

Os tumores não são constituídos por células iguais entre si, pois parecem existir várias populações celulares. Entre os diferentes tipos de células encontramos uma população reduzida que parece estar envolvida em processos essenciais para a sobrevivência do cancro tal como a sua génese, progressão, metastização e recidivas. Estas são as células estaminais do cancro. A sua denominação advém do facto de estas demonstrarem as duas grandes características das células estaminais presentes nos tecidos, a capacidade de autorrenovação e a elevada capacidade de proliferação. Vários são os estudos que se têm feito sobre estas células. Foi demonstrado que estas células são resistentes às terapêuticas, tendo-lhes sido atribuída a responsabilidade não só pela resistência à terapêutica como também pela recidiva dos tumores.

Tendo em conta estas especificidades tornou-se urgente caracterizar e conhecer o fenótipo molecular, o metabolismo e a respostas destas células às terapêuticas disponíveis, assim como, contribuir para desenvolver novas terapêuticas dirigidas. O isolamento desta população de células e a sua propagação *in vitro* seria de extrema conveniência. No entanto, a ausência e o desconhecimento de marcadores celulares que caracterizassem a população de CSC e a reduzida percentagem desta população de células no tumor levantaram barreiras aos estudos. Em 2003 Dontu *et al.* desenvolveram um sistema de cultura *in vitro* de células humanas do epitélio mamário que permitiu a propagação destas células num estado de desdiferenciação, baseado na sua capacidade de se desenvolverem em condições não aderentes. Estas células foram denominadas de mamosferas.¹³² Mais tarde em 2005 Ponti *et al.* utilizando o protocolo descrito por

Gabriella Dontu, confirmou a possibilidade de se isolarem e propagarem células com características de células estaminais do cancro da mama.⁶²

Neste projeto, as linhas celulares de cancro da mama MCF7 e HCC1806 foram submetidas ao protocolo de formação de mamosferas, o que resultou na obtenção de colónias esféricas em suspensão. Foi possível obter células em suspensão com características estaminais em três diferentes gerações sucessivas, submetidas sequencialmente a protocolo de subdiferenciação e respetivas populações derivadas aderentes, que de algum modo refletem uma nova diferenciação na condição nativa, isto é, aderente.

As proteínas, membros da família ALDH têm um papel importante na destoxificação enzimática dos aldeídos endógenos e exógenos das células. De igual modo têm um papel importante na formação de moléculas que são fundamentais em processos celulares, tais como o ácido retinóico e o ácido aminobutírico. Porém, as isoformas 1 e 2 da ALDH exibem funções adicionais não enzimáticas, incluindo a capacidade de se ligarem a algumas hormonas, bem como diminuir os efeitos da radiação ultravioleta na córnea. De igual modo podem desempenhar um papel essencial relacionando com a autoproteção, com a diferenciação e com a expansão celular.⁹⁶ Nas células estaminais a característica de autoproteção é importante para que exista a manutenção da população nos tecidos e no órgão, assegurando o tempo de vida útil da estrutura em questão. A ALDH envolve-se neste mecanismo de autoproteção pelo seu papel na via de sinalização do ácido retinóico e na oxidação intracelular dos aldeídos. Assim esta proteína tem sido utilizada como um marcador das CSC.¹⁰² Ginestier e colaboradores apresentaram em 2007 um estudo sobre células normais e células tumorais do cancro da mama em que verificaram que a atividade destas proteínas está relacionada proporcionalmente com o comportamento característicos das células

estaminais, designado frequentemente na literatura pela expressão *stemness*, nomeadamente, maior capacidade de autorrenovação e de carcinogénese.¹⁰² Mais recentemente Nalwoga e colaboradores (2010) verificaram que a elevada expressão da ALDH 1 se encontrava associada aos cancros da mama com pior prognóstico tal como o *basal-like*, fenótipo molecular sobreponível ao dos tumores triplos negativos.¹³³

Neste trabalho avaliou-se a expressão das proteínas ALDH 1 e 2 através da técnica de *western blot*. Observou-se que, em ambas as linhas celulares, houve um aumento da expressão da ALDH na população de mamíferas em todas as suas gerações, MS1, MS2 e MS3, comparativamente à linha de origem. Este aumento foi sempre acompanhado por uma diminuição da expressão da proteína nas gerações aderentes G1, G2, e G3, obtidas a partir de MS1, MS2 e MS3, respetivamente, igualando o nível de expressão da linha celular que lhes deu origem.

As mamíferas, obtidas pelo protocolo de Dontu e Ponti, têm sido consideradas CSC.^{132,62} Neste estudo, este facto e o sucesso do procedimento realizado foi confirmado pela expressão de ALDH, atualmente descrita como sendo um marcador de CSC.

As populações de células G1, G2 e G3, de fenótipo aderente, obtidas por diferenciação das três gerações de mamíferas, em que a expressão da proteína ALDH retoma os níveis basais, evidenciam a capacidade de diferenciação e de génese de um tecido pela divisão assimétrica que caracteriza as CSC. A hierarquia organizacional das CSC é responsável pela heterogeneidade dos tumores. As CSC exibem capacidade de autorrenovação mas também de diferenciação. A divisão assimétrica propicia a manutenção de um grupo de células com propriedades de CSC, capaz de revelar esta capacidade em gerações sucessivas e, por outro lado, contribuir para a diferenciação de diversos tipos celulares com diferentes características.

A comparação do nível de expressão basal entre as células MCF7 e HCC1806 revela informação de grande interesse. A linha celular HCC1806, com características de cancro da mama triplo negativo, tem uma expressão três vezes superior às células MCF7, características de cancro da mama que expressa recetores hormonais. Sabendo que a expressão de ALDH é diretamente proporcional à agressividade do cancro^{102,133} e já foi correlacionada com a capacidade de metastização¹³⁴, compreendem-se as características de maior malignidade observadas nos estudos de citoquímica. As células ALDH⁺ estão aumentadas nos cancros da mama basais, sobreponível ao fenótipo triplo negativo e, após quimioterapia neoadjuvante, indiciando recidivas à terapêutica.¹³⁵ Assim, este resultado translaciona-se para a prática clínica, em que os tumores triplos negativos surgem associados a maior probabilidade de metastização inicial e a um aumento de recidivas após os tratamentos convencionais.¹³⁶ Os cancros da mama triplos negativos têm uma boa resposta à quimioterapia convencional, no entanto, recidivam precocemente. Especula-se o papel preponderante das CSC nesta resposta, admitindo-se uma maior expressão de ALDH nas células com este fenótipo, que podem justificar a recorrência pós-tratamento. Em contraste, o cancro da mama que expressa recetores hormonais mostra um melhor prognóstico, com menor capacidade de formar metástases e menos recidivas.

Em trabalhos anteriores (Carvalho, 2010) verificou-se que o perfil fenotípico dos recetores hormonais, em modelos animais de metastização baseados nas células HCC1806 e MCF7, não foi sempre consistente com o perfil das células que lhes deram origem.¹³⁷ Pode especular-se a importância das CSC nesta resposta em ratinhos *Balb-c nu/nu*. Lower e os seus colegas em 2005 verificaram discordâncias de expressão de RH entre o tumor primário e a metástase do cancro da mama, concluindo que o tratamento para uma metástase não pode ser determinado com base nas características do tumor

que lhe deu origem. Surge assim a hipótese, que se pretendeu verificar neste trabalho, de que as CSC, bem como células diferenciadas obtidas a partir de CSC, poderiam exibir um fenótipo distinto da linha celular que lhes deu origem.

Neste trabalho foi avaliada, por *western blot*, a expressão dos recetores hormonais de estrogénio α , de estrogénio β e de progesterona, bem como, do recetor HER-2, uma tirosina cinase membranar e um oncogene, que se encontra expresso em cerca de 20% dos cancros da mama. Este recetor, quando ativado e sobreexpresso, dá à célula sinais de proliferação e anti-apoptóticos. Atualmente o HER-2 é utilizado como alvo terapêutico quando é sobreexpresso. Esta terapia quando utilizada como adjuvante junto com a quimioterapia diminui em cerca de 50% os riscos de recorrência do cancro da mama bem como de metástases. O trastuzumab, a primeira terapia que tem como alvo o HER-2, é bem tolerada pelos doentes, com níveis de toxicidade menores comparativamente com a quimioterapia convencional, já que os seus efeitos são apenas sentidos no seu alvo.¹³⁸

O recetor de estrogénio, no cancro encontra-se envolvido em mecanismos de crescimento e de progressão do mesmo. A maioria dos cancros da mama expressa este recetor. Existem dois tipos diferentes do RE, o RE- α e o RE- β , sendo que o primeiro é o que tem relevância clínica, quer diagnóstica quer terapêutica. É sugerido que o RE- α pode estar envolvido na inibição do processo de apoptose. O RE- β pode ter função de supressor tumoral.

Neste trabalho foi medida a expressão de ambos os RE por *western blot*. Nas células HCC1806 verificou-se a não expressão do RE- α . A ausência de expressão deste recetor por esta linha celular corroborou o que se observou nos estudos de imunocitoquímica e tal como descrito anteriormente¹³⁹ a ausência de RE é um dos fatores pelo qual a hormonoterapia não afeta o cancro da mama triplo negativo.

Verificou-se também que as várias gerações de mamóferas e de derivadas aderentes também não expressam este recetor.

Na linha MCF7 comprovou-se a expressão do RE- α quer por *western blot*, quer por imunocitoquímica. No que concerne às CSC, nomeadamente, em MS1, em MS2 e em MS3, verificou-se uma diminuição de expressão deste recetor seguido de um aumento nas gerações derivadas aderentes, as G1, as G2 e as G3.

A nível de expressão do RE- β observaram-se níveis de expressão similares em ambas as linhas celulares. Esta premissa pode constituir uma surpresa relativamente às células triplas negativas, porém deve ter-se em conta que na estratificação clínica dos tumores da mama é o RE- α que é considerado. Além disto existem estudos sobre a implicação que a expressão desta proteína possa ter no prognóstico, na agressividade e sobre a possibilidade de ser um alvo terapêutico para o cancro triplo negativo.^{140;141} Os estudos sobre RE- β indicaram que este recetor tem pelo menos mais duas isoformas¹⁴⁰ e os diferentes níveis de expressão das isoformas do RE- β correlacionados com a expressão ou a ausência do RE- α podem ter implicações no prognóstico do cancro da mama.¹⁴⁰

Tanto nas células HCC1806 como nas MCF7, verifica-se o mesmo perfil de expressão do RE- β , verificando-se o mesmo nas populações celulares derivadas, em que nas células MS1, MS2 e MS3 existe uma diminuição da expressão de RE- β , e nas populações derivadas aderentes, G1, G2, e G3, existe uma expressão similar à linha de origem.

Esta progressão verificou-se também para as células MCF7 e populações suas derivadas no que concerne à expressão do recetor de progesterona e do HER-2. O protocolo de mamóferas induz, na prática, uma sub/desdiferenciação no sentido da perda do fenótipo característico da célula. Esta diminuição da expressão de recetores

hormonais e de HER-2 nas CSC pode significar a regressão do fenótipo destas células, inerente às características de estaminalidade (ou *stemness*) destas células.

Além disto, vários estudos referem a existência de interações entre as vias de sinalização dos RE e do HER-2. Lattrich (2007) mostra que não só o RE- α se encontra envolvido com o HER-2.¹⁴² O seu estudo refere que quando em cancros da mama que expressam recetores hormonais se induz a sobreexpressão da proteína RE- β existe um aumento da expressão de HER-2. Estes dados bibliográficos poderão também justificar um perfil de expressão semelhante entre o RE- α , o RE- β e o HER-2.

Por outro lado Diessner e colaboradores (2014) desenvolveram recentemente estudos na linha MCF7 e em células estaminais que confirmam a diminuição de expressão de HER-2 e colocaram a hipótese de esta diminuição se dever à internalização dos recetores, em resposta à ativação dos próprios.¹⁴³

Porém, o que se verificou neste trabalho é que as mamóferas de cada linha celular apenas se diferenciaram em células com características similares às da respetiva linha celular que lhes deu origem. Al-HAjj, *et al.* (2003) verificou que CSC com um fenótipo CD44⁺/CD24^{-/low} injetadas em ratinhos exibem o mesmo fenótipo do qual lhes deu origem. Existem diferentes tipos de células estaminais, como foi referido anteriormente neste trabalho⁶⁸, e estes dados suportam a hipótese de que as CSC poderão relacionar-se mais com as células estaminais unipotentes, isto é, que apresentam a capacidade de dar origem a um tipo de tecido.

Relativamente às células HCC1806 e às populações suas derivadas não se detetou expressão quantificável de RP e de HER-2. A ausência de RP nas células HCC1806 foi corroborada pelos estudos de imunocitoquímica. A ausência de HER-2 nestas células e nas populações suas derivadas é suportada também por outros estudos publicados recentemente. No estudo de Diessner *et al.* (2014) verifica-se que não existe expressão

de HER-2 na linha HCC1806. Esta ausência de expressão reforça a hipótese de as células triplas negativas, com características de indiferenciação e elevada expressão de ALDH manterem um fenótipo de mais próximo das CSC.¹⁴³

A P53 é uma proteína supressora tumoral com a função principal de levar a célula à apoptose. Esta proteína responde ao stresse celular como o stresse oxidativo, a hipoxia, os danos no DNA e a ativação de oncogenes. A ativação da P53 pode levar à paragem do ciclo celular nas fases G1 ou G2 e a apoptose. Assim podemos afirmar que a P53 é um mediador importante na manutenção da integridade do genoma. Por causa das suas funções e da sua importância na regulação celular, a perda da sua função encontra-se associada à progressão tumoral e a piores prognósticos.¹⁴⁴ Assim a mutação ou a ausência de expressão desta proteína encontra-se diretamente relacionada com a resposta à terapêutica e a um pior prognóstico.

Neste trabalho quando avaliada a expressão desta proteína verificou-se que a linha MCF7 expressa P53. Ao contrário, na linha HCC1806 não se obteve expressão na linha original nem nas diferentes gerações de mamóferas nem nas respetivas gerações derivadas aderentes. Os resultados do *western blot* foram corroborados pelos estudos de imunocitoquímica que mostram que as células HCC1806 não tem expressão da proteína P53 enquanto em 90% nas células MCF7 se encontrou desta proteína.

Em outros estudos com a mesma linha, mas utilizando diferentes técnicas como a sequenciação de DNA ou a análise de polimorfismos (SSCP do inglês, *single-strand conformation polymorphism analysis*) foi confirmada a existência do gene da P53 *wild-type* e a sua expressão.¹⁴⁵ Por sua vez a linha celular HCC1806 é descrita como uma linha que não expressa P53.¹⁴⁵ O facto de esta linha não expressar a P53 é consistente com o comportamento clínico mais agressivo dos cancros da mama triplos negativos uma vez que a P53 é essencial no processo de apoptose.

Nas várias gerações de mamíferas da linha celular MCF7 observou-se uma diminuição da expressão da P53 enquanto nas gerações com fenótipo aderentes se observou um aumento atingindo valores de expressão sobreponível à linha de origem. A diminuição da expressão da proteína P53 pode estar relacionada com as características de células estaminais, nas quais os mecanismos de apoptose não se encontram diminuídos. Esta diminuição da expressão também pode estar relacionada com a agressividade do tumor. A baixa expressão de P53 nas CSC pode ser um dos fatores que explica a resistência ao tratamento levando a que existam recidivas precoces.

Atualmente a radioterapia é uma das terapias mais usadas em todos os tipos de cancro. Sabe-se que a radioterapia é utilizada em 50% dos doentes com cancro, embora a taxa de resposta a esta terapia dependa de cada caso, tendo uma taxa variável a nível da resposta. A dose que é administrada depende da sensibilidade do tumor e dos tecidos que o rodeiam.¹⁴⁶ A sensibilidade do tumor depende das suas características moleculares. A capacidade de agressão já depende da capacidade do tumor para desenvolver metástases e/ou recidivas após o tratamento. Por isso é importante saber as respostas que os diferentes tumores têm quando sujeitos a uma dose de radiação.

Perante os resultados obtidos pelos modelos matemáticos podemos verificar que a linha celular MCF7 é mais resistente à radiação que a linha HCC1806. Nas células MCF7 podemos observar uma diminuição linear do fator de sobrevivência o que sugere que a linha celular tem um bom mecanismo de sobrevivência às agressões provocadas pela radioterapia. Em outros estudos a linha MCF7 tem um comportamento diferente, seguindo o modelo quadrático com um $\alpha=0,215\pm0,080$ e $\beta=0,160\pm0,074$.¹²² Na linha HCC1806 a dose letal que obtivemos foi de 2,247 Gy, existindo estudos com valores aproximados. Para doses mais elevadas o fator de sobrevivência desta linha celular diminui comparativamente ao controlo.

Estes resultados são corroborados com o DL₅₀ (dose letal para 50% da população), sendo que o DL₅₀ para a linha MCF7 é de 3,148 Gy e o DL₅₀ para HCC1806 é de 2,247 Gy, mostrando novamente que as células MCF7 são mais resistente à radioterapia.

A linha celular HCC1806 apresenta, comprovadamente, um índice proliferativo superior ao da linha celular MCF7, o que foi comprovado por estudos de imunocitoquímica com o marcador Ki-67. Este facto poderá estar relacionado com a maior sensibilidade à radioterapia, uma vez que células com maior atividade mitótica, e nomeadamente em fase M do ciclo celular, são mais sensíveis às lesões induzidas por radiação ionizante.

Considerando as células triplas negativas, o grupo minoritário de células que permanece quiescente, escapando aos efeitos da radiação e sendo responsável por recidivas precoces.

Este trabalho possibilitou diversas evidências considerando a comparação de células com recetores hormonais *versus* células triplas negativas. O perfil imunocitoquímico aponta para uma maior agressividade das triplas negativas. A expressão de ALDH foi particularmente notória nas diversas gerações de mamóferas de ambos os tipos celulares, apontando para um fenótipo *stem-cell like*. A expressão de P53 aponta para uma inibição apoptótica nas células TN que também é maior na população de CSC derivadas das células com RH. Os RH e o HER-2 mantêm um perfil sobreponível nas CSC em relação à população de origem, não se constatando aquisição da expressão nas CSC. As células TN respondem mais favoravelmente a doses menores de RT, concordante com a expressão P53 .

CONCLUSÕES

Este estudo experimental *in vitro* permitiu concluir vários aspetos, alguns deles que podem ter uma implicação clínica no que concerne ao cancro da mama.

1. Os estudos de imunocitoquímica corroboraram que as MCF7 expressam RH e as HCC1806 não expressam.

2. As células HCC1806, triplas negativas, têm um fenótipo mais indiferenciado e características de maior malignidade, confirmado pelas características morfológicas e pelos estudos moleculares.

3. Foi possível obter CSC a partir do protocolo de formação de mamosferas, para ambas as linhas celulares.

4. A avaliação molecular mostrou que as CSC adquirem um fenótipo de maior indiferenciação no que concerne a marcadores como a P53 e os recetores de superfície que se encontram diminuídos.

5. As células diferenciadas a partir de CSC recuperam o fenótipo da linha celular original o que relaciona estas células com as células estaminais unipotentes.

6. As HCC1806, células triplas negativas, são mais sensíveis à radioterapia que as células que expressam recetores hormonais.

BIBLIOGRAFIA

1. Weinstein, I. origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment—twenty-seventh GHA Clowes memorial. *Cancer Res.* (1988). at <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/48/15/4135.short>>
2. Loeb, K. R. & Loeb, L. A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 379–385 (2000).
3. Facts, C. Cancer Facts & Figures. (2012).
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. *Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer; 2013. Available from <http://globocan.iarc.fr>, accessed 09/07/2014* 2013 (2013).
5. Hutchinson, L. Breast cancer: challenges, controversies, breakthroughs. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 669–70 (2010).
6. Sestak, I., Cuzick, J. & Evans, G. Breast Cancer: Epidemiology, Risk Factors and Genetics. *ABC Breast Dis.* **321**, (2012).
7. Hall, J., Lee, M., Newman, B. & Morrow, J. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science (80-.).* **250**, 17–22 (1990).
8. Wooster, R., Neuhausen, S., Mangion, J. & Quirk, Y. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science (80-.).* 15–17 (1994). at <<http://www.sciencemag.org/content/265/5181/2088.short>>
9. Lux, M. P., Fasching, P. a & Beckmann, M. W. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J. Mol. Med. (Berl).* **84**, 16–28 (2006).
10. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 955–960 (2010).
11. Horn, P. & Thompson, W. Risk of contralateral breast cancer associations with histologic, clinical, and therapeutic factors. *Cancer* 412–424 (1988). at <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19880715\)62:2%3C412::AID-CNCR2820620228%3E3.0.CO;2-3/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19880715)62:2%3C412::AID-CNCR2820620228%3E3.0.CO;2-3/abstract)>
12. Kumar, R. Breast cancer tumor markers. *J. Solid Tumors* **2**, 43–46 (2012).
13. Kuiper, G. G. *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863–70 (1997).
14. Rastelli, F. & Crispino, S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori* **94**, 370–83 (2008).

15. Greene, G. L. *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* **231**, 1150–4 (1986).
16. Gosden, J. R., Middleton, P. G. & Rout, D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24---q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **43**, 218–220 (1986).
17. Lubahn, D. B. *et al.* Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11162–6 (1993).
18. Kuiper, G. & Enmark, E. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. ...* **93**, 5925–5930 (1996).
19. Wilkinson, H., Dahllund, J. & Liu, H. Identification and characterization of a functionally distinct form of human estrogen receptor β **143**, 1558–1561 (2002).
20. Enmark, E. *et al.* Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4258–65 (1997).
21. Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G. & Gustafsson, J. a. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1486–96 (1997).
22. Vladusic, E. A. *et al.* Expression of Estrogen Receptor β Messenger RNA Variant in Breast Cancer Expression of Estrogen Receptor. 210–214 (1998).
23. Herynk, M. H. & Fuqua, S. a W. Estrogen receptors in resistance to hormone therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **608**, 130–43 (2007).
24. Hill, S. M., Fuqua, S. A. W., Chamness, G. C., Greene, G. L. & McGuire, W. L. Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Associated with an Estrogen Receptor Gene Restriction Fragment Length Polymorphism Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Associated with an Estrogen Receptor Gene Restriction Fragment Length. 145–148 (1989).
25. Yaich, L., Dupont, W. D., Cavener, D. R. & Pan, F. F. Analysis of the Pvu II Restriction Fragment-length Polymorphism and Exon Structure of the Estrogen Receptor Gene in Breast Cancer and Peripheral Blood Analysis of the PvuII Restriction Fragment-length Polymorphism and Exon Structure of the Estrogen Recept. 77–83 (1992).
26. Schuur, E. R. & Weigel, R. J. Monoallelic Amplification of Estrogen Receptor- α Expression in Breast Cancer Advances in Brief Monoallelic Amplification of Estrogen Receptor- α Expression in Breast Cancer 1. 2598–2601 (2000).
27. Ottaviano, Y. L. *et al.* Methylation of the Estrogen Receptor Gene CpG Island Marks Loss of Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Cells

- Advances in Brief Methylation of the Estrogen Receptor Gene CpG Island Marks Loss of Estrogen Receptor Expression in Human Breast . 2552–2555 (1994).
28. Yoshida, T. *et al.* Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor alpha gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis* **21**, 2193–201 (2000).
 29. Sabnis, G. J., Jelovac, D., Long, B. & Brodie, A. The Role of Growth Factor Receptor Pathways in Human Breast Cancer Cells Adapted to Long-term Estrogen Deprivation The Role of Growth Factor Receptor Pathways in Human Breast Cancer Cells Adapted to Long-term Estrogen Deprivation. 3903–3910 (2005).
 30. Nicholson, R. I., McClelland, R. a, Robertson, J. F. & Gee, J. M. Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **6**, 373–87 (1999).
 31. Bezwoda, W. R. *et al.* The Value. (1991).
 32. Elledge, R. M. *et al.* Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int. J. Cancer* **89**, 111–7 (2000).
 33. Wiebe, J. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 717–38 (2006).
 34. Chick, P. C., Sherman, M. R., Corvol, P. L. & Malley, B. W. O. CONTROL MECHANISMS AND BIOCHEMICAL GENETICS : CHARACTERIZATION OF Progesterone-binding Components of Chick Oviduct. (1970).
 35. Dressing, G. E., Hagan, C. R., Knutson, T. P., Daniel, A. R. & Lange, C. A. NIH Public Access. **16**, 351–361 (2014).
 36. Li, H., Fidler, M. L. & Lim, C. S. Effect of Initial Subcellular Localization of Progesterone Receptor on Import Kinetics and Transcriptional Activity. **2**, 509–518 (2005).
 37. Condon, J. C., Hardy, D. B., Kovaric, K. & Mendelson, C. R. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol. Endocrinol.* **20**, 764–75 (2006).
 38. Shen, T., Horwitz, K. & Lange, C. hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6122–6131 (2001).
 39. Weigel, N. L. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* **319** (Pt 3, 657–67 (1996).

40. Ellis, M., Coop, A. & Singh, B. effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1-and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase. *J. Clin. ...* **19**, 3808–3816 (2001).
41. Graham, J. D. & Yeates, C. Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *J. steroid ...* **56**, 93–98 (1996).
42. Korkaya, H., Paulson, a, Iovino, F. & Wicha, M. S. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* **27**, 6120–30 (2008).
43. King, C., Kraus, M. & Aaronson, S. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science (80-.)*. 69–71 (1985). at <<http://www.sciencemag.org/content/229/4717/974.short>>
44. Slamon, D., Clark, G., Wong, S. & Levin, W. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (80-.)*. (1987). at <<http://www.sciencemag.org/content/235/4785/177.short>>
45. Hicks, D. G. & Kulkarni, S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am. J. Clin. Pathol.* **129**, 263–73 (2008).
46. Yarden, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* **61**, 1–13 (2001).
47. Pegram, M., Konecny, G. & Slamon, D. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Adv. Breast Cancer ...* (2000). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-3147-7_4>
48. Normanno, N. *et al.* The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr. Drug Targets* **6**, 243–257 (2005).
49. Olayioye, M. & Neve, R. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**, (2000).
50. Ross, J. S. *et al.* HER-2/neu Testing in Breast Cancer. *Pathol. Patterns Rev.* **120**, 53–71 (2003).
51. Traina, A. *et al.* HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1089**, 159–67 (2006).
52. Ariga, R., Zarif, A. & Korasick, J. Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. *breast ...* **68**, 6–8 (2005).
53. Slamon, D. & Leyland-Jones, B. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. ... *Engl. J. ...* **344**, 783–792 (2001).

54. Osoba, D. Effects on Quality of Life of Combined Trastuzumab and Chemotherapy in Women With Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3106–3113 (2002).
55. Sørliie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–74 (2001).
56. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–23 (2003).
57. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–52 (2000).
58. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–11 (2001).
59. Mimeault, M. & Batra, S. K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* **24**, 2319–45 (2006).
60. Yun, K. & Tennent, B. Cancer stem cells. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **4**, 47–52 (2007).
61. Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K. A. & Sasiadek, M. M. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J. Appl. Genet.* **49**, 193–199 (2008).
62. Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N. & Pratesi, G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* **65**, 5506–5511 (2005).
63. Kim, R.-J. *et al.* High aldehyde dehydrogenase activity enhances stem cell features in breast cancer cells by activating hypoxia-inducible factor-2 α . *Cancer Lett.* **333**, 18–31 (2013).
64. Chen, K., Huang, Y. & Chen, J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 732–40 (2013).
65. Huntly, B. J. P. & Gilliland, D. G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 311–321 (2005).
66. Kucia, M. & Ratajczak, M. Z. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J. Physiol. Pharmacol.* **57 Suppl 7**, 5–16 (2006).
67. Bonnet, D. & Dick, J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).

68. 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.* **100**, 3983–3988 (2003).
69. Mani, S. a *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–15 (2008).
70. Ponti, D., Zaffaroni, N., Capelli, C. & Daidone, M. G. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur. J. Cancer* **42**, 1219–24 (2006).
71. Laranjo, M., Carvalho, M. & Botas, F. 182 Breast Cancer Stem Cells Glycolytic Metabolism and Response to Chemotherapy. ... *J. Cancer* **48**, S44 (2012).
72. Gangopadhyay, S., Nandy, A., Hor, P. & Mukhopadhyay, A. Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. *Clin. Breast Cancer* **13**, 7–15 (2013).
73. Beug, H. Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy? *Cell* **138**, 623–5 (2009).
74. Dippold, W. G., Jay, G., DeLeo, a B., Khoury, G. & Old, L. J. P53 Transformation-Related Protein: Detection By Monoclonal Antibody in Mouse and Human Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 1695–9 (1981).
75. Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263 (1979).
76. Baker, S. J. *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217–21 (1989).
77. Sigal, a & Rotter, V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* **60**, 6788–93 (2000).
78. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
79. Lamb, P. & Crawford, L. Characterization of the human p53 gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1379–85 (1986).
80. Isobe, M., Emanuel, B., Givol, D., Oren, M. & Croce, C. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. (1986). at <<http://www.nature.com/nature/journal/v320/n6057/abs/320084a0.html>>
81. Slee, E. a, O’Connor, D. J. & Lu, X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* **23**, 2809–18 (2004).
82. Kern, S. E. *et al.* Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**, 1708–11 (1991).
83. Jr, W. K. The p53 gene family. *Oncogene* **53**, 7701–7705 (1999).

84. Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. & Prendergast, G. C. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15**, 887–98 (1997).
85. Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. & Prives, C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* **10**, 2438–2451 (1996).
86. Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594–604 (2002).
87. Bode, A. M. & Dong, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 793–805 (2004).
88. Oren, M. & Rotter, V. Introduction: p53--the first twenty years. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 9–11 (1999).
89. Bonizzi, G., Cicalese, A., Insinga, A. & Pelicci, P. G. The emerging role of p53 in stem cells. *Trends Mol. Med.* **18**, 6–12 (2012).
90. Bai, L. & Zhu, W. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol* 141–153 (2006). at <[http://mupnet.com/JOCM 2\(4\) 141-153.pdf](http://mupnet.com/JOCM 2(4) 141-153.pdf)>
91. Levine, a J. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**, 323–31 (1997).
92. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, a J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307–10 (2000).
93. Racker, E. Aldehyde dehydrogenase, a diphosphopyridine nucleotide-linked enzyme. *J. Biol. Chem.* (1949). at <<http://www.jbc.org/content/177/2/883.short>>
94. Yoshida, A. & Rzhetsky, A. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* **557**, 549–557 (1998).
95. Oraldi, M. *et al.* Importance of inverse correlation between ALDH3A1 and PPAR γ in tumor cells and tissue regeneration. *Chem. Biol. Interact.* **191**, 171–6 (2011).
96. Jackson, B. *et al.* Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum. Genomics* **5**, 283–303 (2011).
97. Black, W. & Stagos, D. Human Aldehyde Dehydrogenase Genes: Alternatively-Spliced Transcriptional Variants and Their Suggested Nomenclature. *Pharmacogenetics ...* **19**, 893–902 (2009).
98. Chen, C.-H., Sun, L. & Mochly-Rosen, D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc. Res.* **88**, 51–7 (2010).

99. Wall, T. L. Genetic associations of alcohol and aldehyde dehydrogenase with alcohol dependence and their mechanisms of action. *Ther. Drug Monit.* **27**, 700–703 (2005).
100. Yoshida, A., Hsu, L. C. & Davé, V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Enzyme* **46**, 239–244 (1992).
101. Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F. & Nebert, D. W. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**, 421–434 (1999).
102. Ginestier, C., Hur, M. & Charafe-Jauffret, E. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–567 (2007).
103. Anderson, E. BREAST IORT USING INTRABEAM RADIOTHERAPY SYSTEM A Guide to Physician-Patient Discussions RADIATION THERAPY.
104. Wang, S.-L. et al. Epidemiologic Study of Radiotherapy Use in China in Patients With Breast Cancer Between 1999 and 2008. *Clin. Breast Cancer*, **XX**, (2012).
105. Clarke, M. *et al.* Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **366**, 2087–106 (2005).
106. Secretariat, E., Building, R. D. & Ox, O. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death : meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials Early Breast Cancer Trialists ' Collaborative Group (EBCTCG). 1–24
107. Buzdar, A. *et al.* Anastrozole, a potent and selective aromatase inhibitor, versus megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer: results of overview analysis of two phase III trials. *J. Clin. Oncol.* **14**, 2000–11 (1996).
108. Gebiski, V., Lagleva, M., Keech, A., Simes, J. & Langlands, A. O. Survival effects of postmastectomy adjuvant radiation therapy using biologically equivalent doses: A clinical perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 26–38 (2006).
109. Held, K. D. Basic clinical radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* **86**, 996 (2010).
110. Shafiq, J., Delaney, G. & Barton, M. B. An evidence-based estimation of local control and survival benefit of radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* **84**, 11–17 (2007).
111. Chen, M.-F. *et al.* Predictive factors of radiation-induced skin toxicity in breast cancer patients. *BMC Cancer* **10**, 508 (2010).

112. Veronesi, U. *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1227–1232 (2002).
113. Meyn, R. E., Stephens, L. C. & Milas, L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 119–131 (1996).
114. Neve, R. M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**, 515–527 (2009).
115. Huguet, E. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Bicknell, R. & Harris, A. L. Differential Expression of Human Wnt Genes 2 , 3 , 4 , and 7B in Human Breast Cell Lines and Normal and Disease States of Human Breast Tissue Lines and Normal and Disease States of Human Breast Tissue . 2615–2621 (1994).
116. Emler, D. R. *et al.* HER2 expression as a potential marker for response to therapy targeted to the EGFR. *Br. J. Cancer* **94**, 1144–53 (2006).
117. Gazdar, a F. *et al.* Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* **78**, 766–74 (1998).
118. Adan, Y. *et al.* Phenotypic differentiation of human breast cancer cells by 1,3 cyclic propanediol phosphate. *Cancer Lett.* **194**, 67–79 (2003).
119. Yau, C. & Benz, C. C. Genes responsive to both oxidant stress and loss of estrogen receptor function identify a poor prognosis group of estrogen receptor positive primary breast cancers. *Breast Cancer Res.* **10**, R61 (2008).
120. Grimshaw, M. J. *et al.* Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **10**, R52 (2008).
121. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **17**, 1253–70 (2003).
122. Pauwels, B. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **51**, 221–6 (2003).
123. Matos, L. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomark. Insights* **9** (2010). doi:10.4137/BMIS2185
124. Puig-Vives, M. *et al.* Distribution and prognosis of molecular breast cancer subtypes defined by immunohistochemical biomarkers in a Spanish population-based study. *Gynecol. Oncol.* **130**, 609–14 (2013).
125. Howland, N. K. *et al.* Lymph node involvement in immunohistochemistry-based molecular classifications of breast cancer. *J. Surg. Res.* **185**, 697–703 (2013).

126. Allahverdiyev, A., Bagirova, M. & Oztel, O. Aldehyde Dehydrogenase: Cancer and Stem Cells. 3–28 (2012). at <http://perweb.firat.edu.tr/personel/yayinlar/fua_1909/1909_77355.pdf>
127. Jelski, W. & Szmitkowski, M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin. Chim. Acta.* **395**, 1–5 (2008).
128. Ellmann, S. *et al.* Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2405–26 (2009).
129. Wang, Z. *et al.* MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquiritigenin. *Oncotarget* (2014). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026296>>
130. Arumugam, A., Lissner, E. a & Lakshmanaswamy, R. The role of hormones and aromatase inhibitors on breast tumor growth and general health in a postmenopausal mouse model. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 66 (2014).
131. Xenograft, C. *et al.* MDM2 Molecular Imaging for the Prediction of Chemotherapeutic Sensitivity in Human Breast Cancer Xenograft. **13**, 1–10 (2014).
132. Dontu, G. & Abdallah, W. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes ...* **17**, 1253–1270 (2003).
133. Nalwoga, H., Arnes, J., Wabinga, H. & Aklsen, L. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. *Br. J. Cancer* **102**, 369–75 (2009).
134. Charafe-Jauffret, E. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 45–55 (2010).
135. Britton, K. M., Kirby, J. a, Lennard, T. W. J. & Meeson, A. P. Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis. *Cancers (Basel)*. **3**, 2106–30 (2011).
136. Croker, A. K. *et al.* High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 2236–52 (2009).
137. Carvalho, M. Padrão de metastizção das células tumorais da mama. (2010).
138. Manuscript, A. & Implications, C. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 55–62 (2011).
139. Steiman, J., Peralta, E. a, Louis, S. & Kamel, O. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *Am. J. Surg.* **206**, 698–703 (2013).

140. Murphy, L. & Leygue, E. The role of estrogen receptor- β in breast cancer. *Semin. Reprod. Med.* **30**, 5–13 (2012).
141. Hartman, J., Ström, A. & Gustafsson, J.-åke. Estrogen receptor beta in breast cancer — Diagnostic and therapeutic implications. **74**, 635–641 (2009).
142. Lattrich, C., Juhasz-boess, I., Ortmann, O. & Treeck, O. Detection of an elevated HER2 expression in MCF-7 breast cancer cells overexpressing estrogen receptor β 1. **2**, 811–817 (2008).
143. Diessner, J. *et al.* Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine (T-DM1). *Cell Death Dis.* **5**, e1149 (2014).
144. Cai, Z. *et al.* Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* **15**, 2817–26 (1997).
145. Fan, L. Z. & Cherian, M. G. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **87**, 1019–26 (2002).
146. Begg, A. C., Stewart, F. a & Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 239–53 (2011).

