

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HELEN SOARES VALENÇA FERREIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DO GENE ANEXINA A2 E DO
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA NO
CÂNCER DE MAMA**

PATOS DE MINAS – MG

MAIO DE 2019

HELEN SOARES VALENÇA FERREIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DO GENE ANEXINA A2 E DO
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA NO
CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS – MG

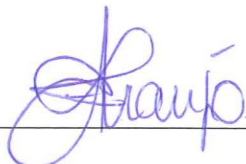
MAIO DE 2019

HELEN SOARES VALENÇA FERREIRA

Expressão diferencial dos transcritos do gene Anexina A2 e do Receptor do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina no Câncer de Mama.

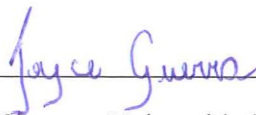
Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:



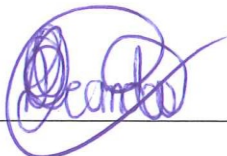
Dra. Thaise Gonçalves de Araújo - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia

Presidente



Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia

Membro



MSc. Douglas Cardoso Brandão - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia

Membro

“O aluno que não questiona seu mestre é um servo e não um aprendiz.”

Petrus Logus o guardião do tempo

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a mulher mais guerreira, persistente e corajosa que eu conheço. A você mainha agradeço por todo esforço que você fez e faz todos os dias por mim. Para mim a senhora é a prova real de que nós mulheres podemos mais. A senhora me criou sozinha e para tal precisou trabalhar muito, às vezes dois ou três dias seguidos sem descansar, precisou carregar peso e se submeter a situações exaustivas. Tudo isso para me alimentar e não me deixar faltar nada. Te agradeço por tudo! Foram inúmeras às vezes em que eu pensei em desistir do curso, frente as dificuldades que surgiam, nessas horas eu me recordava que a senhora mainha, passou por muito mais dificuldades do que eu, passou por inúmeras privações, de descanso, de alimento e tantas outras, mas ainda assim você não desistiu e se mantém firme até hoje. Foi a persistência que a senhora demonstrou em toda sua vida que me fez continuar. A senhora mainha, me deu o melhor presente que os pais podem dar aos seus filhos: o EXEMPLO! A senhora não me deu tudo que eu queria, mas me deu o que eu mais precisava, o SEU EXEMPLO. Obrigada! Te agradeço por ter sido e por ser um grande pai e uma grande mãe, porque para mim você foi e sempre será os dois!

Agradeço também aos meus professores! A absolutamente a todos, desde os que me deram aula no maternal até hoje ao que me dão aula na graduação. Agradeço a todos vocês por terem me mostrado o caminho e por me fazerem crescer. Admiro muito TODOS vocês! A maioria das pessoas, especialmente aqui no Brasil, não conseguem compreender o quanto VOCÊS são importantes, mas espero que um dia as pessoas alcancem essa compreensão. TODA profissão passa por um professor e sem você professor, o crescimento e o desenvolvimento intelectual do indivíduo seria inviável. Agradeço a vocês professores que ainda acreditam que a educação transforma! Agradeço pelas noites maldormidas para correção de atividades e elaboração de provas e projetos, por terem que receber baixos salários, por muitas vezes terem que suportar abusos em sala de aula, discriminação e às vezes até terem que lidar com a violência e ainda assim vocês persistem, ainda assim vocês acreditam. Vocês me ensinaram muito além do português, da matemática, da química, da biologia molecular e etc. Vocês me ensinaram valores! Ensinaram-me lições que transcendem as paredes da sala de aula e que irão me acompanhar o resto da vida. Assim como vocês eu acredito que a educação transforma, pois ela me transformou! Obrigada por terem sido os agentes dessa transformação! Não deixem de acreditar que o professor é o profissional mais importante para o crescimento e desenvolvimento de qualquer país e as pessoas ainda vão perceber isso. Não desistam! Continuem acreditando! E obrigada por acreditarem em mim!

Agradeço também a uma professora em especial. Agradeço a você Thaise, por ser uma pessoa única, uma professora exemplar e uma orientadora comprometida e exigente! Você Thaise é um exemplo para todos nós, seus alunos, uma mulher competente e extremamente eficiente em tudo o que se propõe a fazer. Te agradeço por todo o cuidado e carinho com as correções e com as críticas durante o desenvolvimento desse trabalho. Às vezes ficamos tristes com as críticas, mas acredito que o orientador ao fazê-las, busca extrair de nós, seus orientandos, o melhor. E acredito que só conseguimos melhorar se aceitarmos que erramos e

que a partir do erro podemos seguir um caminho diferente. Obrigada por ter me mostrado outros caminhos! O carinho e admiração que sinto por você irão permanecer comigo para sempre, pois acredito que a cada dia você irá se tornar uma profissional cada vez melhor. E desejo de verdade que um dia eu possa ser uma profissional tão competente e eficiente como você! Obrigada por compartilhar comigo um pouquinho do seu vasto conhecimento e por ter me ensinado que nós podemos usar esse conhecimento para fazer do mundo um lugar melhor! Para trazer sorrisos em meio a tantas tristezas! Obrigada Thaise! Você é uma excelente orientadora, uma profissional impecável e uma grade mulher.

Agradeço também aos meus amigos e família! A Todos que de alguma forma contribuíram para que eu estivesse aqui! Vocês me deram apoio, afeto, carinho, amizade, exemplo e amor! Graças a todos vocês eu consegui chegar até aqui e espero conseguir chegar ainda mais longe para poder deixá-los orgulhosos! Amo vocês e obrigada por tudo!

Agradeço também ao meu namorado, Pablo Neander, por me aguentar a quase 5 anos (kkk), por me dá amor, carinho e apoio em todos os momentos que precisei! Nas muitas vezes em que pensei em desistir era você que estava sempre ao meu lado me dizendo para continuar! Era você que estava sempre ao meu lado acreditando em mim, acreditando que eu poderia ser melhor e que eu poderia fazer melhor! Obrigada por não ter desistido de me incentivar nas inúmeras vezes em que isso se fez necessário! Você é uma pessoa maravilhosa, carinhosa e inteligente e a única voz que se fez presente ao meu lado nos momentos em que mais difíceis durante a graduação! Sim, eu tive momentos realmente muito difíceis e você estava lá, ao meu lado em todos eles. Obrigada amor!

Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia *campus* Patos de Minas! A universidade não é feita apenas de alunos, ela é feita por inúmeras pessoas que trabalham em conjunto por um bem maior: A EDUCAÇÃO! Sendo assim, agradeço a todos da UFU Patos, aos professores, aos técnicos, aos colegas de classe e a todos que desempenham um papel no crescimento e desenvolvimento desta Universidade. Como eu aprendi e cresci com vocês! Obrigada UFU Patos! Para sempre você estará no meu coração! Acredito que a Universidade representa hoje a parte mais difícil da minha vida, tanto no âmbito acadêmico quanto no âmbito emocional, uma vez que é na fase da Universidade na qual nós mais nos tornamos adultos e torna-se adulto é a matéria mais difícil que nós podemos fazer, porque não tem professor, você tem que aprender sozinho! A Universidade é uma das fases da vida e crescer não é um processo simples, crescer é algo extremamente difícil! Então agradeço a UFU Patos por ter me propiciado algo tão necessário!

Por último, mas de todos o mais importante, agradeço a DEUS por tudo! Por ter me dado força, coragem e persistência em todos os momentos da minha vida em que estes foram necessários. Por ter me colocado à minha volta pessoas amadas que me ajudaram a vencer e por estar comigo todos os dias e em todos os momentos! Agradeço a Deus por ter nos amado de tal maneira, nós seres tão difíceis e complicados, ao ponto de nos dar o maior exemplo de amor e de esperança que o mundo já viu: CRISTO! Acredito que a vida de Cristo foi o maior exemplo de cuidado e carinho pelo próximo! Cristo manifestava seu amor pelas suas palavras e principalmente, pela sua conduta, Ele não discriminava, não odiava e não maltratava as pessoas,

independente do quanto estas, fossem diferentes dEle. Cristo sabia amar o diferente, afinal todos nós diferimos uns dos outros, mas infelizmente é possível notar o quanto as pessoas têm dificuldades em viver o verdadeiro amor de Cristo, principalmente aqueles que dizem segui-lo. Mas assim como Ele acreditou em nós, eu também acredito! Tenho certeza que Jesus não morreu em vão, se Ele se sacrificou por amor foi porque acreditou que nós também podíamos fazê-lo! Amar verdadeiramente ao próximo significa sacrificar nossos conceitos e preconceitos e despojarmo-nos dos parâmetros que usamos para “medir” o outro, afinal “o verdadeiro amor não tem medidas” e Cristo nos demonstrou isso com sua vida e a sua conduta! Obrigada Jesus pelo maravilhoso exemplo que temos tanta dificuldade em seguir!

RESUMO

Considerando que neoplasias malignas decorrem da desregulação de vias de sinalização celulares, mecanismos relacionados à Anexina A2 (ANXA2) têm sido descritos associados à tumorigênese mamária. Essa proteína encontra-se envolvida com o controle de vias de transdução, como PI3K-AkT-mTOR, a qual pode ser também ativada pelo Receptor do Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1 (IGFR1). Nosso estudo objetivou quantificar os transcritos de *ANXA2* e do *IGFR1*, por qPCR, em linhagens celulares mamárias, além de correlacioná-los aos níveis de mRNA de Anexina A1 (*ANXA1*), conhecidamente mais expressos no Câncer de Mama Triplo-negativo (CMTN), um subtipo mais agressivo da doença. Foram utilizadas as linhagens celulares mamárias MCF10A (não tumorigênica), MCF7 (fenótipo luminal A) e MDA-MB231 (fenótipo basal triplo-negativo). O método Ct comparativo foi previamente validado e os dados normalizados com o gene de referência Beta-2-microglobulina (*B2M*). O gene *ANXA2* foi significativamente mais expresso em células MDA-MB231 em comparação às demais linhagens ($P < 0,01$) e os transcritos de *IGFR1* foram significativamente mais expressos em células MCF7 ($P < 0,01$). Já o perfil de expressão transcricional de *ANXA1* foi semelhante à *ANXA2* e, inclusive, observou-se uma correlação positiva entre ambos ($R = 0,99$; $P < 0,01$). Não foi identificada correlações com os transcritos de *IGFR1*. Nossos resultados sugerem as Anexinas presentemente estudadas como importantes marcadores para o CMTN. Considerando o *IGFR1*, este se mostrou superexpresso no CM luminal, evidenciando sua possível utilização como um alvo terapêutico adicional nesse subtipo. Contudo, estudos adicionais em nível protéico são necessários para melhor elucidar o sinergismo e a função dessas proteínas no CM, sobretudo no CMTN.

Palavras-chave: Câncer de mama. Marcadores moleculares. qPCR. AnexinaA2. IGFR1.

ABSTRACT

Considering that malignant neoplasms arise from the deregulation of cell signaling pathways, mechanisms related to Annexin A2 (ANXA2) have been described associated to mammary tumorigenesis. This protein is involved in the control of transduction pathways, such as PI3K-AkT-mTOR, which can also be activated by the Insulin I-like Growth Factor Receptor (IGFR1). Our study aimed to quantify the ANXA2 and IGFR1 transcripts by qPCR in Breast cell lines and to correlate them to Annexin A1 (ANXA1) mRNA levels, known more expressed in Breast Cancer Triple-negative (TNBC), a more aggressive subtype of the disease. The mammary cell lines MCF10A (non-tumorigenic), MCF7 (luminal A phenotype) and MDA-MB231 (triple-negative basal phenotype) were used. The comparative Ct method was previously validated and the data normalized with the reference gene Beta-2-microglobulin (B2M). The ANXA2 gene was significantly more expressed in MDA-MB231 cells compared to the other strains ($P < 0.01$). IGFR1 transcripts were significantly more expressed in MCF7 ($P < 0.01$) cells. The ANXA1 transcriptional expression profile was similar to ANXA2, and a positive correlation was observed between both ($R = 0.99$, $P < 0.01$). No correlations were identified with IGFR1 transcripts. Our results suggest the Annexins presently studied as important markers for TNBC. Considering IGFR1, it has been shown to be overexpressed in the luminal BC, suggesting its possible use as an additional therapeutic target in this subtype. However, additional studies at the protein level are needed to better elucidate the synergism and function of these proteins in BC, especially in TNBC.

Keywords: *Breast cancer. Molecular markers. qPCR. Annexin A2. IGFR1.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% por cento

®: Registrado

°C: Grau Celsius

µg: Microgramas

µL: Microlitros

µM: Micromolar

3': 3 linha

4EBP1: Proteína 1 4E-ligante

4EBP1: *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

5': 5 linha

AEG: Análise de expressão gênica

Akt/PKB: Proteína quinase B

ANOVA: Análise de Variância

ANXA1: Anexina A1

ANXA2: Anexina A2

APM: Análise do perfil molecular

B2M: *Beta-2-Microglobulin*

BRAC 1: *Breast Cancer Type 1*

BRAC 2: *Breast Cancer Type 2*

Ca²⁺: Íon cálcio

cap: *Catabolite activator protein*

CCNB1: Ciclina B1

cDNA: DNA complementar

CK14: Citoqueratina 14

CK17: Citoqueratina 17

CK5: Citoqueratina 5

CK6: Citoqueratina 6

CM: Câncer de Mama

CMNT: Câncer de Mama Triplo Negativo

CO₂: Dióxido de carbono

Ct: *Cycle threshold*

C-terminal: Carboxi-terminal

Cys8: Cisteína 8

dATP: desoxiAdenosina Trifosfatada

dCTP: desoxiCitidina Trifosfatada

DEPC: Dietil pirocarbonato

dGTP: desoxiGuanosina Trifosfatada

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA: Ácido desoxirribunucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DP: Desvio Padrão

dTTP: desoxiTimidina Trifosfatada

E-caderina: Caderina epitelial

EDTA: Ácido Etileno diamino tetra-acético

EGF: Fator de crescimento Epidérmico

eIF-3: *Eukaryotic initiation factor 3*

eIF-4E: *Eukaryotic initiation factor 4E*

EMT: Transição epitélio-mesenquimal

FDA: *Food and Drug Administration*

FKBP-12: Proteína de ligação a FK506 de 12 KDa

FRB: Domínio de ligação FKBP12-rapamicina

FRPs Receptores de peptídeos formílicos

G1: Gap 1

gdDTPA: Gadolínio-dietilenotriaminapentacetato

HER1: Receptor do tipo 1 do fator de crescimento epidérmico humano

HER2 +: Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (Positivo)

HER2: Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

IGF1: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1

IGFR1: Receptor do tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina

IR: Receptor de insulina

IRS: Substrato do receptor insulínico

IRS1: Substrato do receptor insulínico do tipo 1 IRS1

KDa: *kilodaltons*

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKK: Proteína quinase quinase ativada por mitógeno

MCF10A: *Michigan Cancer Foundation-10 Attached*

MCF7: *Michigan Cancer Foundation-7*

MDA-MB231: *MD Anderson-Metastatic Breast 231*

MKi67: Marcador de Proliferação de Ki67

mL: Mililitros

mM: Milimolar

MMLV-RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

mRNA : Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR: Alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1: Subunidade catalítica de mTOR do tipo 1

mTORC2: Subunidade catalítica de mTOR do tipo 2

MYBL2: Proto-oncogene MYB similar ao 2

nm: Nanômetros

N-terminal: Amino-terminal

p: Probabilidade

p110: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade catalítica

p-4EBP1: Proteína 4EBP1

p53: Proteína 53

p63: Proteína 63

p85: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade regulatória

p-AKT: Proteína AKT

P-caderina: Caderina placentária

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDK1: Proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PIKK: quinase relacionada a fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2: Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

pmol: Picomol

pmoles: Picomoles

p-S6: Proteína S6

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*

RAF: Fibrossarcoma Rapidamente Acelerado

RAPTOR: *Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*

RAS: *Rat sarcoma virus*

RE: Receptor de Estrógeno

RICTOR: *Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*

RNA: Ácido ribonucleico

RP: Receptor de Progesterona

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute médium*

S100A10: Proteína de ligação ao cálcio S100 A10

S473: Serina 473

S6K1: *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*

Shc: Proteína homóloga ao colágeno com domínio SH2

T308: Treonina 308

TBE: Tris/Borato/EDTA

TOR: proteína alvo da rapamicina

TSC 1/2: *Tuberous sclerosis complex 1 and tuberous sclerosis complex 2*

TTN: Tumores triplo-negativos

Tyr: Tirosina

U: Unidade

UV: Ultravioleta

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Aspectos epidemiológicos	16
2.2 A caracterização dos tumores mamários	18
2.3 A via de sinalização mTOR e o Câncer de Mama	25
2.4 Anexina A2 e o câncer de mama	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos:	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Linhagens Celulares	32
4.2 Extração de RNA	33
4.3 Transcrição Reversa	33
4.4 PCR convencional para validação das amostras.....	33
4.5 Quantificação dos transcritos por qPCR	34
4.6 Análises Estatísticas	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de mama (CM) é caracterizado pelo crescimento e proliferação desordenados das células que compõem o tecido mamário, comprometendo sua estrutura e função. Uma vez que a mama é composta por diferentes tecidos e tipos celulares, o CM é classificado em diferentes subtipos, tanto histológicos quanto moleculares (DONEPUDI et al., 2014; BELL; BARRACLOUGH; VASIEVA, 2017; HAMMERL et al., 2018). Essa complexidade torna imperativa a adoção de diferentes abordagens terapêuticas direcionadas para cada subgrupo, para melhor manejo das pacientes. Contudo, marcadores específicos para determinados subtipos, como o CM triplo-negativo (CMTN) ainda não foram descritos e se mostram essenciais em terapias direcionadas. Ainda, mesmo para os cânceres luminais, para os quais se adota a hormonioterapia, quadros de resistência são rotineiros. Nessa conjuntura, a busca por moléculas-alvo que possibilitem a melhor compreensão da biologia tumoral e, por conseguinte, o desenvolvimento de novos tratamentos, torna-se indispensável para uma melhor perspectiva de sobrevida de mulheres diagnosticadas com a doença.

Considerando que neoplasias malignas decorrem da desregulação de vias de sinalização celulares somada a modificações na atividade e/ou expressão de seus componentes proteicos, mecanismos relacionados a proteína Anexina A2 (ANXA2) têm sido associados ao desenvolvimento de tumores. Alterações na expressão de ANXA2 já foram descritas em carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, leucemia aguda promielóica, câncer de pâncreas, câncer de próstata e CM (ZHANG et al., 2012). Essa proteína encontra-se relacionada a eventos fisiológicos-chave para a tumorigênese, incluindo invasão, metástase e quimiorresistência. Além disso, é associada ao controle de vias de transdução, como PI3K-AkT-mTOR, a qual pode ser também ativada pelo Receptor do Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGFR1).

No presente estudo quantificamos os transcritos de *ANXA2* e do *IGFR1* em linhagens de CM, além de relacioná-los aos níveis de mRNA de Anexina A1 (*ANXA1*), conhecidamente mais expressos no CM triplo-negativo (CMTN), um subtipo mais agressivo da doença. Nossos resultados incitam pesquisas funcionais adicionais objetivando avaliar a função desempenhada pela ANXA2 no CM em conjunto com a via insulínica, buscando melhor compreender os mecanismos genéticos e bioquímicos relacionados ao desenvolvimento e progressão da doença, sobretudo do CMTN.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos epidemiológicos

A palavra câncer é um termo empregado para designar um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam como características em comum o crescimento e a multiplicação desordenados de células. Esse fenômeno determina o desenvolvimento de neoplasias na área afetada e pode desencadear o processo de metástase, meio pelo qual as células tumorais podem se estabelecer em novos sítios distantes (INCA, 2004).

Atualmente o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, responsável por 8,8 milhões de óbitos em 2015 (World Health Organization - WHO, 2019). No Brasil, estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) apontam a ocorrência de 600 mil casos novos da doença para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2019).

Dentre as neoplasias malignas mais comuns, o câncer de mama (CM) é a mais incidente na população feminina mundial e brasileira, com exceção aos casos de câncer de pele não melanoma. Segundo o INCA, o CM corresponde a cerca de 25% dos casos novos a cada ano (INCA, 2014). As regiões Sudeste e Sul foram as que registraram o maior número de óbitos, com 14,25 e 13,70/100.000 mulheres, respectivamente, no ano de 2013 (INCA, 2016). Para o Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de CM, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).

O tumor mamário é uma patologia cujo desenvolvimento está relacionado a diversos fatores, o que torna a pesquisa sobre suas causas e origens um estudo extremamente complexo. Sua etiologia é influenciada tanto por fatores intrínsecos (inerentes ao indivíduo), como taxas hormonais, faixa etária e predisposição genética, quanto por fatores extrínsecos como o consumo de álcool, tabagismo, o uso de contraceptivos orais, dieta alimentar e sedentarismo (RADICE; REDAELLI, 2003).

Segundo Winters et al. (2017) a idade permanece como um dos fatores mais relevantes. Evidências indicam que o CM é a principal causa de mortes relacionadas ao câncer em mulheres com mais de 45 anos. Dados globais sustentam a correlação entre a idade e o CM, uma vez que, em todo o mundo, a doença alcança seu ápice por volta dos 60 anos, com uma predisposição acentuada a partir dos 40 anos (ANASTASIADI et al., 2017; WINTERS et al., 2017).

O tempo de exposição aos hormônios sexuais, incluindo os concernentes ao ciclo menstrual, configura um importante fator de risco (DUMITRESCU; COTARLA, 2005). As

mulheres que apresentam menarca com idade inferior a 12 anos têm uma maior propensão ao desenvolvimento de CM, na ordem de 10 a 20%, assim como aquelas que entraram na menopausa tardiamente, com idade superior a 55 anos (PARKIN; BRAY; DEVESA, 2001). Nos casos apresentados, o desenvolvimento do tumor é corolário do maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno, que atua como indutor da multiplicação das células do tecido mamário (KEY, 1999). Além de ativar a proliferação celular, acredita-se que o estrogênio possua efeito anti-apoptótico, inibindo, desse modo, a morte celular programada das células que sofreram danos em seu DNA (NAROD; FOULKES, 2004).

Em relação aos aspectos genéticos, o histórico familiar é considerado um fator de risco efetivamente estabelecido (HULKA; MOORMAN, 2001). Estima-se que entre 5 e 10% de todos os casos de CM estão relacionados à herança de mutações genéticas, o que leva à instauração da doença em mulheres jovens. Para a análise de vínculo são considerados o histórico familiar, a existência de parentes acometidos pela doença em três gerações, número de parentes diagnosticados de primeiro grau igual ou superior a dois no período da pré-menopausa, presença na família de casos de CM bilateral e existência de casos dessa neoplasia em homens (KERR; ASHWORTH, 2001; ROSENTHAL; PUCK, 1999).

Em 1994 o primeiro gene de predisposição ao CM, *BRCA1* (do inglês: *breast cancer type 1*), localizado no braço longo do cromossomo 17, foi caracterizado (MIKI et al., 1994) a partir de análises de ligação envolvendo amostras biológicas de famílias que apresentavam numerosos casos de neoplasias mamárias malignas (HALL et al., 1990). Em 1995 o *BRCA2* (do inglês: *breast cancer type 2*), segundo gene relacionado à doença, foi descrito no braço curto do cromossomo 13 (WOOSTER et al., 1995; TAVTIGIAN et al., 1996). As pesquisas desenvolvidas na área oncológica demonstram que a transformação neoplásica resulta de uma série de mutações progressivas e cumulativas que interferem em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. (MACLEOD, 2000).

Os proto-oncogenes, como o HER2 (Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano), regulam de forma positiva a multiplicação celular em resposta a estímulos fisiológicos. Algumas mutações relacionadas a esses genes levam à formação de uma forma protéica que se mantém permanentemente ativa, o que resulta em um processo de proliferação contínuo e independente de estímulos internos (WEINBERG, 1996; CHEN; HUNTER, 2005). Já os supressores de tumor, como o *BRCA1/2* e *p53*, podem ser distribuídos em duas categorias: a dos “*gatekeepers*” e a dos “*caretakers*” (MACLEOD, 2000). Os genes *gatekeepers* são responsáveis por regular de forma negativa a multiplicação celular ou de forma positiva o processo de apoptose protegendo a célula de um crescimento descontrolado (SIMAO et al.,

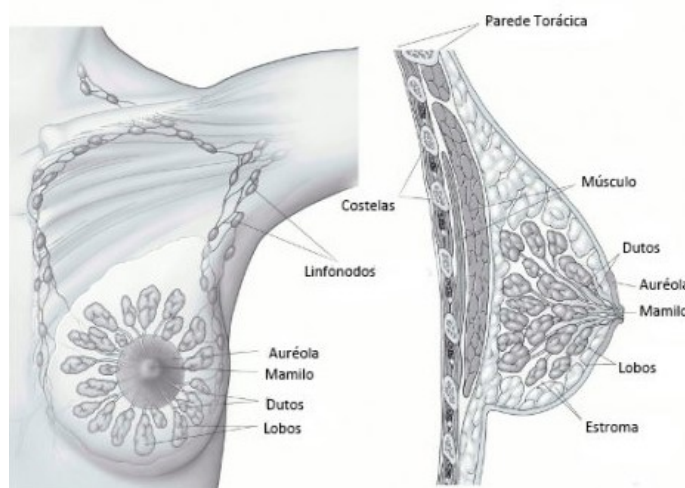
2002; KUROSE et al., 2002). Os genes supressores de tumor classificados como *caretakers*, suprimem de forma indireta o crescimento tumoral, atuando na codificação de proteínas voltadas para a manutenção da integridade do material genético (LEVITT; HICKSON, 2002). Quando, portanto, as alterações afetam esses genes que regulam de forma direta ou indireta a multiplicação ou sobrevivência das células, se não reparadas ou reparadas de forma incorreta, promovem a proliferação celular maligna (MACLEOD, 2000).

2.2 A caracterização dos tumores mamários

O CM é um grupo heterogêneo de doenças que apresenta comportamentos peculiares. Sua complexidade pode ser observada pelas diferentes manifestações clínicas e morfológicas, perfis moleculares, distintas assinaturas genéticas e consequentes diferenças nas respostas terapêuticas (PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001).

Para se compreender os mecanismos através dos quais o CM atua e as alterações resultantes de seu desenvolvimento, é necessário entender a estrutura e função dos componentes da mama (Figura 1). Caracterizada como um órgão hormônio-dependente e de distribuição bilateral, a mama é localizada na parede anterior do tórax e recoberta por pele. Na superfície, em sua porção central, apresenta o complexo aréolo-papilar, pelo qual são liberadas para o ambiente externo as secreções, exsudações e transudatos (DELMANTO, 2012).

Figura 01. Componentes estruturais da mama.



Adaptado. (American Cancer Society, 2019).

Anatomicamente, pode ser dividida nos componentes estrutural e funcional. O componente estrutural, denominado estroma mamário, é responsável pela sustentação e

proteção subdividindo-se em interlobular e intralobular. Na mulher jovem, o estroma interlobular é formado majoritariamente por tecido conjuntivo denso (fibroso), contando ainda com a presença de algumas células de tecido adiposo. O estroma intralobular apresenta-se como um tecido conjuntivo frouxo e com uma pequena quantidade de linfócitos, além de responder às flutuações hormonais. A distribuição dos tecidos que constituem o estroma é modificada de acordo como ciclo hormonal, a faixa etária, a dieta alimentar e a predisposição genética. No que concerne à faixa etária, com o avançar dos anos, a quantidade de tecido adiposo aumenta enquanto proporcionalmente o tecido conjuntivo diminui. Já o componente funcional, denominado parênquima mamário, desempenha as funções de produção e secreção de leite (DÂNGELO; FATTINI, 2003; NETTER, 2004).

Constituído basicamente por células epiteliais, o parênquima mamário possui uma porção secretora formada por 15 a 20 lóbulos. Os lóbulos são estruturas que apresentam contorno circular, formados pela aglomeração de ácinos e ductos envolvidos pelo estroma interlobular (BIRNBAUM et al., 2004). Os ácinos são as unidades funcionais responsáveis por secretar o leite e apresentam dois tipos celulares em sua composição: uma camada interna constituída de células epiteliais e uma camada externa constituída de células mioepiteliais, cuja função é contrair-se para promover a expulsão do leite. Os ductos mamários ou ductos lactíferos (se estendem do lóbulo ao seio lactífero) apresentam uma composição celular similar à dos ácinos: são formados por uma dupla população de células de revestimento com elevado teor de água em sua composição, sendo responsável pela drenagem dos lóbulos (WOODWARD et al., 2005).

O CM é uma anormalidade que surge no tecido mamário, comprometendo sua estrutura e função. De acordo com sua natureza as neoplasias podem ser caracterizadas de duas formas distintas: benigna ou maligna. As benignas possuem como característica primordial o crescimento lento e o estroma semelhante ao tecido de origem. As neoplasias malignas são oriundas de células cujo DNA sofreu processo de mutação e apresentam crescimento e proliferação desordenados, o que caracteriza a perda do processo de inibição por contato, podendo, inclusive, se tornarem invasivas (CONCEIÇÃO, 2008).

No que concerne à localização e extensão, os tumores de mama malignos são classificados em carcinoma *in situ* e invasor. De acordo com a sua origem, podem ser classificados em ductais (que têm seu desenvolvimento nos ductos mamários e representam cerca de 80% das lesões) e lobulares (que se desenvolvem na porção interior dos lóbulos representando cerca de 10 a 15% dos casos incidentes) (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). Outras neoplasias que acometem as mamas são, em geral, mais raras e incluem tumores

mucinosos, inflamatórios, medulares, tubulares ou papilares (OLIVEIRA, 2011). Baseando-se na sua localização, extensão e origem os carcinomas mamários podem ser classificados em diferentes subgrupos conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 01. Subdivisão dos carcinomas mamários de acordo com a localização, extensão e origem.

Classificação	Características
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Caracterizado pela multiplicação irregular de células epiteliais malignas dentro das estruturas do parênquima mamário e encerradas nos ductos por uma membrana basal intacta (ELLSWORTH et al., 2007).
Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Considerado muitas vezes como uma situação pré-cancerosa, este subgrupo é caracterizado pela proliferação de fibroblastos e ácinos no interior dos lóbulos, região à qual essas células ficam restritas, não ocorrendo migração para áreas circundantes (VIANA; MARTINS; GEBER, 2001).
Carcinoma ductal invasivo	Definido como um tumor pouco diferenciado, cuja distribuição das células forma cordões sólidos que infiltram difusamente o tecido mamário. A expressão ductal invasivo se refere ao fato das células tumorais invadirem os tecidos epiteliais dos ductos e migrarem para outras regiões. A extensa proliferação fibroblástica e produção de colágeno é uma característica intimamente relacionada ao desenvolvimento desse tipo de tumor. Esses carcinomas são mal delimitados em sua periferia e não apresentam cápsula, infiltrando, desse modo, o tecido adiposo e o tecido mamário pré-existente (CONCEIÇÃO, 2008).
Carcinoma lobular invasivo	Caracteriza-se pela presença de pequenas células dispostas em um arranjo linear com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. Esse tumor pode vir a se apresentar como uma massa tangível (como os carcinomas ductais) ou então com uma lesão mal definida e difusa, o que confere maior dificuldade à sua detecção e diagnóstico principalmente pela mamografia e ultrassonografia (BIGLIA et al., 2007).

A mamografia é o método mais conhecido e largamente empregado para a detecção do CM. Contudo, diante de problemas quanto à sua sensibilidade, outros métodos instrumentais como a ressonância magnética e a ultrassonografia têm sido empregados no diagnóstico da doença (RIEBER et al., 1997; SODERSTROM et al., 1997). Estudos têm demonstrado que a ressonância magnética, quando comparada à mamografia, apresenta maior efetividade na distinção entre lesões benignas e malignas, uma vez que mostra, com maior riqueza de detalhes,

o tamanho e características morfológicas do tumor e sua relação com as estruturas anatômicas circundantes. Grande parte das lesões malignas são mais irrigadas e permeáveis, facilitando o processos de impregnação do gdDTPA (gadolínio) em seu interior (RIEBER et al., 1997; DAWSON; BLOMLEY, 1994; SODERSTROM et al., 1997).

A ultrassonografia, desde a década de 70, despertou o interesse e expectativa de muitos pesquisadores no diagnóstico do CM. Comparada aos outros métodos apresenta aspectos positivos bem relevantes, não é invasiva, não utiliza radiação e traz informações importantes que se somam às obtidas no exame físico e na mamografia, gerando, assim um diagnóstico mais preciso (VASCONCELOS et al., 2011).

Independentemente do método utilizado, a avaliação adequada é importante nos estágios iniciais da doença, o que aumenta as chances de cura. O diagnóstico tardio é um dos principais fatores relacionados à alta taxa de mortalidade. Concomitante, o acesso limitado da população ao tratamento, seja devido ao baixo poder aquisitivo ou à precariedade e sucateamento do atendimento público, leva ao aumento do número de mortes (RODRIGUES; CRUZ; PAIXÃO, 2015).

Após diagnóstico, a análise do perfil molecular (APM) do CM tem se mostrado essencial no prognóstico das pacientes. Baseada na caracterização dos diferentes perfis de expressão (teste padrão-ouro), a APM permite identificar e discriminar os subtipos tumorais e estabelecer uma correlação com fatores clínicos significativos como tempo de sobrevida livre e global da doença (SØRLIE et al., 2003; BERTUCCI; BIRNBAUM; GONCAVES, 2006; RAHMAWATI et al., 2018). Desse modo APM das neoplasias malignas da mama apresenta implicações importantes no desenvolvimento de terapias individualizadas e mais precisas, o que culmina na adoção de condutas clínicas mais adequadas e minimiza o emprego de tratamentos ineficazes e tóxicos (ROUZIER et al., 2005; PRAT et al., 2015).

Inicialmente foram identificados cinco subtipos moleculares, nomeadamente: luminal A, luminal B, os que superexpressam HER2, basal e normal-like (mama-normal símile) (PEROU et al., 2000; SØRLIE, 2004; WANG; DU; LI, 2017). Posteriormente o subtipo molecular designado *Claudin-Low*, foi identificado (HERSCHKOWITZ et al., 2007).

Os subtipos luminais são assim designados devido à similaridade das células malignas com as mamárias normais que circundam o lúmen dos ductos mamários (FAN et al., 2006; HASHMI et al., 2018). O subtipo luminal A, cujo fenótipo é positivo para expressão do receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) e negativo para a superexpressão de HER2 (SOTIRIOU et al., 2003; HU et al., 2006), representa cerca de 60% dos casos (FAN et

al., 2006; ALCALÁ-CORONA et al., 2017) e é caracterizado pela expressão acentuada de genes correspondentes às células epiteliais luminais (PRAT; PEROU, 2011).

Dentre todos os subtipos moleculares do CM, o luminal A é o que está associado ao melhor prognóstico e responde a intervenções terapêuticas baseadas na aplicação de antiestrogênicos, como o tamoxifeno e inibidores de aromatase (HU et al., 2006; WEIGEL; DOWSETT, 2010; GOLDFIRSCH et al., 2011; GOLDFIRSCH et al., 2013). O RE e o RP são proteínas que integram a superfamília dos receptores nucleares aos quais se ligam os hormônios circulantes, conhecidamente estrogênio e progesterona, desencadeando suas respostas celulares no epitélio mamário (RENOIR; MARSAUD; LAZENNEC, 2013). As células tumorais RE-positivas dispõem do esteróide hormonal estradiol (estrogênio) como elemento essencial para seu crescimento, o que o torna o principal alvo das terapias endócrinas. A manifestação do RE é considerada um importante biomarcador, uma vez que possibilita avaliar os níveis de sensibilidade à hormonioterapia (KARGER; FREIBURG, 2010).

Os tumores classificados como luminal B, em sua maioria, são RE e RP-positivos, não obstante por vezes, esses receptores apresentam baixos níveis de expressão (VODUC et al., 2010). Esses tumores são assinalados pela expressão reduzida ou moderada de genes expressos pelas células epiteliais luminais e por expressarem genes vinculados ao HER2 e marcadores de proliferação celular como MKI67 (Ki-67), CCNB1 (Ciclina B1) e MYBL2 (Proto-oncogene MYB similar ao 2) (SØRLIE, 2004; ALISON, 2012; MOTA et al., 2017). Seu alto índice proliferativo está associado à assinatura de pior prognóstico, sendo regularmente associado à recidiva tumoral e a uma menor sobrevida livre da doença (PAIK et al., 2004; CHEANG et al., 2009; HAQUE et al., 2012), bem como à maior possibilidade de desenvolver resistência ao tratamento com tamoxifeno (KENNECKE et al., 2010).

Ainda para o luminal B, foi proposta uma segmentação para este subgrupo em subtipo luminal B e luminal HER2 na qual o primeiro é caracterizado pela expressão de um ou de ambos os receptores hormonais (RE e RP), ser HER2 negativo e apresentar um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% das células tumorais imunomarcadas. O luminal HER2 é definido pela superexpressão desse oncogene associado à presença dos receptores hormonais (CHEANG et al., 2009; VODUC et al., 2010).

O subtipo molecular definido pela superexpressão de HER2 é caracterizado pela amplificação da oncoproteína HER2 que integra a família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (CIANFROCCA; GOLDSTEIN; 2004; SØRLIE et al., 2006) (HUDIS, 2007; JIANG; RUGO, 2015; YOUNG; ARTEAGA; COOK, 2015; MYBURGH, et al., 2016). Este está associado à segunda pior assinatura de prognóstico (VODUC et al., 2010; YANG et

al., 2011). Contudo, a positividade para HER2 possibilita a utilização de terapias alvo-específicas com drogas capazes de bloquear sua atividade. Nesse contexto, destaca-se o trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia HER2 promovendo melhora nas taxas de respostas ao tratamento, na sobrevida das pacientes e na redução da progressão da doença. (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010; WEIGEL; DOWSETT, 2010; CONSTANTINIDOU; SMITH, 2011; KUMAR et al., 2017).

O subtipo basal é assim designado por manifestar características peculiares às células basais/mioepiteliais (NIELSEN et al., 2004; ALCALÁ-CORONA et al., 2017) e por apresentar negatividade tanto para expressão dos receptores hormonais, quanto para HER2, o que sugere a ineficiência de tratamentos com bloqueadores hormonais e anticorpos monoclonais (IRVIN; CAREY, 2008; BAYRAKTAR; GLÜCK, 2013; METZGER-FILHO et al., 2013). As células neoplásicas desse subtipo apresentam positividade para as citoqueratinas CK5, CK6, CK14 e CK17, Receptor do tipo 1 do fator de crescimento epidérmico humano (HER1), P-caderina e p63, e baixa expressão do gene *BRCA1* (BERTUCCI et al., 2000; MATOS et al., 2005; DE BROT et al., 2009). Cerca de 20% dos cânceres desse subtipo apresentam mutação germinativa ou somática de *BRCA1* e *BRCA2* (ESTELLER et al., 2000).

Devido à negatividade para RE, RP e HER2, alguns pesquisadores se referem aos tumores basais como tumores triplo-negativos (TTN), contudo sabe-se que nem todos os TTN são basais (HAUPT; RO; SCHWARTZ, 2010; KENNECKE et al., 2010). Já que não permite o emprego de terapias endócrinas alvo-específicas, o subtipo triplo-negativo basalóide apresenta uma assinatura de pior prognóstico vinculado à menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global (HICKS et al., 2006; FULFORD et al., 2007; GU; DUSTIN; FUQUA, 2016; TERRANOVA-BARBERIO et al., 2017).

O subtipo molecular normal breast-like foi inicialmente caracterizado pela expressão elevada de genes característicos às células adiposas, às epiteliais normais da mama, a demais células do estroma e por não expressarem os marcadores tumorais rotineiros. Contudo sabe-se, atualmente, que se trata de uma contaminação com o tecido mamário normal durante a realização das análises de perfil de expressão gênica (WEIGELT et al., 2010; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

O subtipo molecular *Claudin-low* é definido pela redução na expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, destacando-se as claudinas 3, 4 e 7, as ocludinas e a E-caderina (HERSCHKOWITZ et al., 2007; MENDES et al., 2015). As claudinas são proteínas transmembrana implicadas no processo de junção entre as células, sendo que a redução em seus níveis de expressão viabilizam

a migração celular e a invasão tecidual (PRAT et al., 2010). No que concerne aos marcadores tumorais RE, RP e HER2, os tumores do tipo *Claudin-Low* são caracterizados por exibirem preferencialmente, fenótipo triplo-negativo, o que os incluem no grupo dos subtipos com pior prognóstico e alta recidiva. Uma vez que não apresentam alvos terapêuticos reconhecíveis, a identificação de marcadores moleculares específicos para este subtipo é de extrema relevância para alcançar maior precisão no diagnóstico e no desenvolvimento de condutas terapêuticas eficazes (DENT et al., 2007; BERTOS; PARK, 2011; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; NOBREGA et al., 2016).

Para elucidar os mecanismos de promoção e progressão do CM, diferentes modelos *in vitro* foram estabelecidos (QU et al., 2015). Dentre as linhagens celulares mamárias mais empregadas destacam-se a MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231.

Derivada do tecido mamário proliferativo benigno e espontaneamente imortalizada, a linhagem celular MCF-10A é constituída por células epiteliais não tumorigênicas. Estas foram extraídas de uma mulher caucasiana, pré-menopausa com idade de 36 anos, submetida à mastectomia. As células MCF-10A são positivas às sialomucinas epiteliais, citoqueratinas e à antígenos de gordura do leite, sendo negativas para RE, RP e não apresentam a amplificação de HER2. São responsivas à insulina, glicocorticoides, enterotoxina da cólera e fator de crescimento epidérmico (EGF). Quanto à sua morfologia, exibem características das células do ducto luminal, mas não mioepiteliais (QU et al., 2015; American Type Culture Collection - ATCC, 2019; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2019).

Originária da glândula mamária e derivada de sítio metastático, a linhagem celular MCF-7 foi estabelecida a partir da efusão pleural de uma mulher caucasiana de 69 anos diagnosticada com adenocarcinoma (SIGMA-ALDRICH, 2019). As células MCF-7 são classificadas no subtipo molecular luminal A e são consideradas uma linhagem celular pouco agressiva. Estas células são positivas ao RE e RP e à marcadores epiteliais como E-caderina, β -catenina e citoqueratina 18 (CK18). São negativas para marcadores mesenquimais, como a vimentina, e para amplificação de HER2, além de serem responsivas ao estrogênio. Diferentes estudos têm demonstrado que a responsividade das células MCF-7 ao estrogênio está vinculada à secreção de um fator autócrino que ativa o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGFR1). Quanto à sua morfologia, retêm várias características das células epiteliais que compõem o tecido mamário diferenciado, dentre estas destacam-se a capacidade de processar o estradiol via receptores estrogênicos citoplasmáticos e a capacidade de formar agregados tridimensionais multicelulares que podem amadurecer para esferoides contendo um lúmen (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015; ATCC 2019).

Derivada de sítio metastático, a linhagem celular MDA-MB231 foi estabelecida a partir da efusão pleural de uma mulher caucasiana de 51 anos diagnosticada com adenocarcinoma mamário metastático. São positivas aos receptores do fator de crescimento epidérmico e do fator de crescimento transformador alfa, além de negativas aos RE, RP e à amplificação de HER2. Portanto, são definidas como triplo-negativas (ATCC, 2019). Consideradas altamente agressivas e invasivas, as células MDA-MB231 são pouco diferenciadas e, quando implantadas ortotopicamente, formam xenoenxertos que metastizam espontaneamente para os linfonodos. Sua capacidade de invasão é mediada por degradação proteolítica da matriz extracelular. (European Collection of Authenticated Cell Cultures - ECACC, 2017; ATCC, 2019).

Nessa conjuntura, torna-se mandatório desvendar a sinalização envolvida na caracterização e progressão de tumores mamários. Considerando os triplo-negativos e a ausência de medicamentos específicos para seu tratamento, compreender seus mecanismos moleculares certamente auxiliará na descoberta de novos alvos e, portanto, no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Algumas rotas, receptores e proteínas superexpressas ou mutadas durante a tumorigênese já foram exemplificadas, dentre estas a mTOR.

2.3 A via de sinalização mTOR e o Câncer de Mama

A via mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) é uma das principais vias envolvidas no crescimento, proliferação e sobrevivência celulares, controlando diversos processos que incluem a biossíntese de proteínas e lipídios, a biogênese, o metabolismo mitocondrial e lisossomal e a autofagia (GUERTIN; SABATINI, 2007; LAPLANTE; SABATINI, 2012). A desregulação dessa via encontra-se relacionada a diversos processos patológicos como câncer, obesidade, neurodegeneração e diabetes do tipo 2 (ZONCU; SABATINI; EFEYAN, 2011). Sua expressão é realizada a partir de uma cascata de reações que levam à transdução de um sinal quando ocorre a ativação da proteína TOR. Essa proteína está intrinsicamente associada à descoberta da rapamicina, que se refere ao metabólito secundário purificado pela primeira vez da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, em 1970 (KATZUNG, 2003).

A rapamicina é uma gama-lactona macrocíclica insolúvel em água e altamente solúvel em lipídios. Possui potente ação antifúngica e em experimentos em cultura de células humanas apresentou ação antitumoral e imunossupressora (BENJAMIN et al., 2011). Em 1999 esta droga recebeu aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizada como inibidor da rejeição renal de pacientes transplantados. Já nos anos de 2007 e 2009, duas indústrias

farmacêuticas conseguiram a aprovação para sua utilização no tratamento de câncer renal em estágio avançado. (LOEWITH; HALL, 2011).

A eficácia da rapamicina como antitumoral está relacionada ao seu efeito citostático, ou seja, à sua capacidade de induzir a parada do ciclo celular, especificamente na fase G1, inibindo a via mTOR. No caso de linhagens celulares derivadas de tumores, o metabólito também apresenta potencial para induzir apoptose (DILLING et al., 1994; WANG et al., 2010; XU et al., 2010).

A identificação da proteína alvo da rapamicina (TOR) foi realizada primordialmente em cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* que se mostravam resistentes à atividade antiproliferativa do metabólito. Esse estudo também contribuiu para a elucidação do mecanismo de interação entre ambas as moléculas, em que a rapamicina demanda um cofator intracelular, a proteína de ligação FK506 de 12 KDa (FKBP-12) e, após complexação, interage com o domínio de ligação a FKBP12-rapamicina (FRB) de TOR, promovendo, assim, sua inativação (HEITMAN; MOVVA; HALL, 1991; DOWLING et al., 2010).

A proteína mTOR é uma serina treonina quinase membro da família PIKK (quinase relacionada a fosfatidilinositol 3-quinase) que contém aproximadamente 289 KDa. A mTOR é a subunidade catalítica de dois complexos distintos: mTORC1 e mTORC2 (HARA et al., 2002; SARBASSOV et al., 2004). As duas principais proteínas acessórias que distinguem esses complexos são a proteína regulatória associada a mTOR (RAPTOR) e a RICTOR (do inglês *rapamycin-insensitive companion*), que caracterizam o mTORC1 e o mTORC2, respectivamente (HARA et al., 2002; SARBASSOV et al., 2004). De modo sucinto, a mTOR, quando ativada, fosforila vários fatores de transcrição, promovendo, dessa forma, o aumento na expressão de genes que codificam enzimas da síntese de lipídeos, proliferação mitocondrial e aumento na produção de ribossomos (NELSON; COX, 2014).

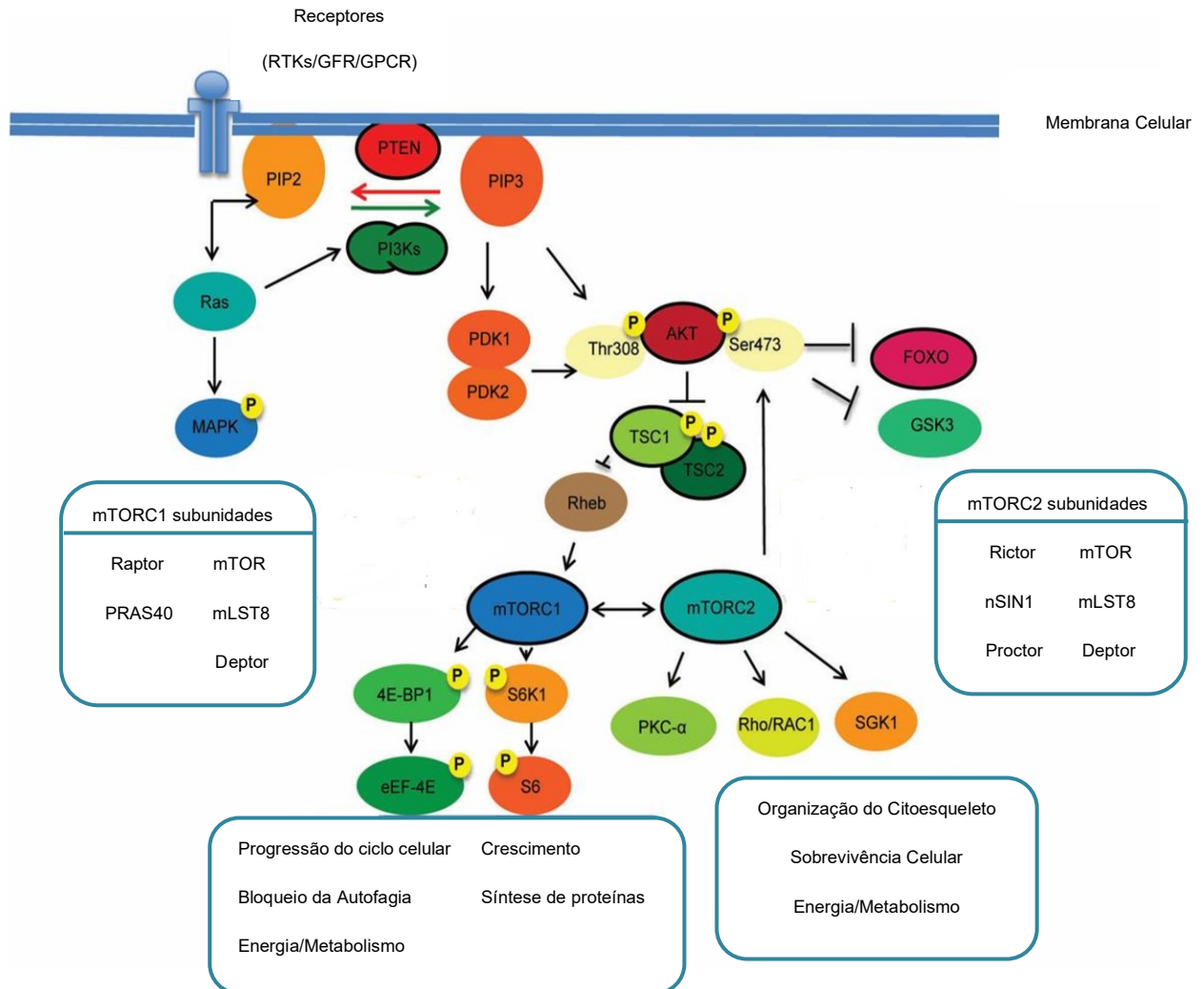
Quanto aos seus complexos, mTORC1 fosforila a proteína 1 4E-ligante (4EBP1) e a S6-quinase (S6K1), ambas essenciais na regulação da tradução cap-dependente e cap-independente (SCHMELZIE; HALL, 2000). Interessantemente, o aumento na tradução cap-dependente decorrente da ativação aberrante de mTORC1 resulta no aumento do tamanho e proliferação celulares; duas marcas importantes no desenvolvimento e progressão tumorais. 4EBP1 e S6K1 são proteínas que se ligam a eIF-4E e eIF-3, respectivamente, inibindo a formação do complexo de iniciação da tradução (RICHTER; SONENBERG, 2005; RAUGHT et al., 2000). Quando fosforiladas por mTORC1, 4EBP1 e S6K1 não mais se ligam aos fatores de iniciação, facilitando, assim, o processo traducional (LAPLANTE; SABATINI, 2009; KIM, 2016).

Em contraste ao mTORC1, muito menos se conhece sobre a via de mTORC2. Sabe-se que esta é insensível a presença de nutrientes, mas responde a fatores de crescimento, tais como a insulina, por meio de um mecanismo que requer a PI3K. Originalmente, este complexo ficou conhecido por ser resistente à rapamicina, uma vez que o tratamento agudo com o fármaco não inibia a sinalização de mTORC2 (JACINTO et al., 2004). Contudo, estudos demonstraram que o tratamento com a rapamicina em longo prazo promove a redução da sinalização via mTORC2 em alguns tipos celulares (PHUNG et al., 2006; SARBASSOV et al., 2006). O complexo TOR2 foi identificado pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* como moderador da organização de actina e da polarização celular (SARBASSOV et al., 2004; LOEWTHI et al., 2002; JACINTO et al., 2004).

A ativação de mTOR pode ser desencadeada mediante a presença de insulina, fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF1), dentre outros sinais que integram a uma complexa rede que controla diferentes processos (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). Caracterizada estruturalmente como uma proteína de pequeno peso molecular, a insulina é composta por duas cadeias polipeptídicas unidas entre si por meio de pontes dissulfeto (BRANGE et al., 1997; CHOI et al., 2009). Secretada pelas células beta pancreáticas em resposta ao aumento da concentração de glicose sanguínea e dos níveis circulantes de aminoácidos pós-prandial, a insulina é um hormônio anabólico indispensável à manutenção da homeostase de glicose, bem como ao crescimento e à proliferação e diferenciação celulares (DUFRANE; NENQUIN; HENQUIN, 2007; GIOVANNUCCI et al., 2010; HARDIE, 2012; BAUMGARD; HAUSMAN; SANZ FERNANDEZ, 2016).

Na presença da insulina, o receptor de insulina (IR) fosforila as proteínas IRS (substrato do receptor insulínico), as quais se encontram conectadas a duas vias: a PI3K/AKT/PKB, responsável pelas ações metabólicas da insulina, e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a qual regula a expressão de genes envolvidos no processo de mitogênese e diferenciação celular (LI; BROWN; GOLDSTEIN, 2010; KHORAMI et al., 2015; CAI et al., 2016; IKINK et al., 2016; CHOI et al., 2018). No tocante à via MAPK, a fosforilação em tirosina nos IRS ou em proteínas Shc (proteína homóloga ao colágeno com domínio SH2), pelo IR ativado, leva à ativação da proteína Ras (proteína codificada pelo proto-oncogene Ras) (ROJAS; OLIVA; SANTOS, 2011). Esta, combinada a integrantes da família de proteínas quinase Raf, promove a fosforilação e ativação da MAPKK (Proteína quinase quinase ativada por mitógeno) (MCLENDON et al., 2008; NAKADA et al., 2011; KAKU et al., 2014).

No que concerne à via PI3K/AKT/PKB, tanto o IR quanto o IGF1R podem fosforilar pelo menos seis IRSs, os quais são capazes de interagir com a enzima fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). A PI3K é caracterizada como uma proteína heterodimérica sinalizadora, cuja estrutura é formada por uma subunidade catalítica (p110) vinculada a uma subunidade regulatória (p85) (MABUCHI et al., 2015). A ligação dos IRSs com PI3K estimula a atividade enzimática da subunidade catalítica p110, responsável pela conversão de PIP2 (fosfatidilinositol-3,4-bifosfato) à PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) elevando desse modo, os níveis citoplasmáticos desse composto (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006; THIRONE; HUANG; KLIP, 2006; SIDDLE, 2011). O aumento da concentração de PIP3 no citoplasma conduz ao recrutamento e à ligação da proteína quinase B (AKT ou PKB) e seu ativador a montante proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos (PDK1) (BELLACOSA et al., 2004). PDK1 catalisa a fosforilação de AKT em T308, o que leva a uma ativação parcial dessa proteína. Posteriormente, uma fosforilação em S473, mediada por mTORC2 conduz à ativação enzimática completa de AKT. A Akt fosforila o inibidor de mTORC1 e substrato de Akt rico em prolina-40 (PRAS40), inibindo desse modo a supressão da sinalização de mTORC1. Ademais, uma inativação do complexo de esclerose tuberosa (TSC 1/2) acionada por Akt leva à ativação de mTORC1 (POTTER; PEDRAZA; XU, 2002; SARBASSOV et al., 2005; NEPSTAD et al., 2018). Nesse processo, a proteína PTEN (do inglês: *phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*) atua como antagonista, uma vez que limita a formação de PIP2 (Figura 02) (HAY; SONENBERG, 2004; SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012).

Figura 02. Via de sinalização mTOR.

Adaptado. (KYRANTE HENRY, 2017).

Observa-se que a via de sinalização mTOR está envolvida em diversos mecanismos relacionados ao anabolismo e à sobrevivência e proliferação celulares, os quais são essenciais para assegurar o desenvolvimento e a manutenção do organismo. Contudo, alterações dessa via têm sido constantemente associadas ao desenvolvimento de diversas neoplasias, dentre estas o CM. Nessa conjuntura, compreender as nuances que abrangem a via mTOR em diferentes condições do indivíduo torna-se imperativo para elucidar sua função no desenvolvimento de tumores, o que pode vir a ampliar as perspectivas terapêuticas tanto no que concerne ao aperfeiçoamento dos métodos já empregados, quanto à concepção de novos tratamentos para a doença.

Com efeito, mutações nessa rede de sinalização são constantemente vinculadas ao câncer, especialmente ao de mama, no qual aproximadamente 70% das neoplasias apresentam

mutações que hiperativam a via PI3K/AKT/mTOR (LAURING; PARK; WOLFF, 2013; KOBOLDT et al., 2012). Segundo Ciriello et al. (2015) alterações genéticas no gene PIK3CA, que codifica a subunidade catalítica de PI3K, especificamente p110 α , são comuns no CM. Mutações nesse gene ocorrem em 45% dos subtipos luminal A, enquanto no luminal B, HER2+ e nos basais estão presentes em 30, 39 e 9% dos casos, respectivamente (MAYER; ARTEAGA, 2014; ADAMCZYK et al., 2017).

Huang et al. (2007) afirmaram que mutações nesse domínio intensificam a atividade catalítica de p110 α reduzindo o efeito inibitório de p85. Essas alterações moleculares também são associadas ao substrato do receptor insulínico do tipo 1 (IRS1), uma vez que favorecem a interação entre p110 α e esta molécula (HAO et al., 2013).

Sugere-se que a ativação da via PI3K/ AKT/ mTOR no CM também pode ser resultado da inativação de algum inibidor. Gewinner et al. (2009) e Koboldt et al. (2012) relataram que a ativação da via PI3K/ AKT/ mTOR no CM triplo-negativo ocorre principalmente devido à perda de PTEN, um inibidor de PI3K. A depleção de PTEN tem sido associada ao aumento nos níveis de p-AKT, p-S6 e p-4EBP1, proteínas relacionadas aos processos de sobrevivência e proliferação celulares. Adamczyk et al. (2017) também constataram que 81,1% dos tumores analisados foram caracterizados com baixa expressão de PTEN.

Contudo a compreensão de como mTOR está envolvido no CM ainda é incipiente, o que exige pesquisas mais robustas sobre os mecanismos envolvidos. Novos estudos devem ser realizados para elucidar de forma minuciosa os meios pelos quais mTOR induz o desenvolvimento e a proliferação das neoplasias malignas da mama e, sobretudo, as interações moleculares-chaves envolvidas em sua ativação e resposta.

2.4 Anexina A2 e o câncer de mama

A Anexina A2 (ANXA2) é uma proteína pertencente à superfamília das anexinas, definida por sua capacidade em se ligar a fosfolipídios aniônicos de membrana de forma cálcio dependente (CLARK et al., 2012; RESCHER; GERKE, 2004; BHARADWAJ et al., 2013). Encontra-se expressa no citoplasma, na membrana e no núcleo de múltiplos tipos celulares, como células endoteliais, mononucleares, células da medula e também em células neoplásicas (GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005; LOKMAN et al., 2011). Não obstante às suas funções intracelulares, a ANXA2 também atua no meio extracelular, sendo secretada tanto sob a forma de moléculas solúveis (dispersas no meio) ou em exossomos (MAJI et al., 2017).

Como todos os membros da família das anexinas, a ANXA2 apresenta um domínio central de segmentos repetidos. Conhecidamente, esse domínio é composto por quatro repetições de aproximadamente 70 aminoácidos cada, contendo cada uma cinco α hélices com diversas regiões de ligação ao íon Ca^{2+} . A ANXA2 exibe uma conformação molecular planar estruturalmente disposta em duas faces: uma convexa voltada para a membrana plasmática na qual estão localizadas as regiões de ligação ao íon Ca^{2+} e a fosfolipídios e uma face côncava voltada para o exterior da membrana celular, sendo este o local onde se encontram as regiões C e N-terminais da ANXA2. Constitutivamente, a região C-terminal apresenta um resíduo reativo de cisteína, diversos locais de ligação a filamentos de actina, fibrina, fosfolipídios e a heparina. No que concerne à região N-terminal, um resíduo de cisteína reativo (Cys8), um domínio de ligação à proteína S100A10, múltiplos locais de fosforilação e um sinal de exportação nuclear são seus elementos constituintes (LUECKE et al., 1995; MADUREIRA et al., 2011; MADUREIRA; WAISMAN, 2013).

Portanto, a ANXA2 contém, em seu domínio N-terminal, regiões congruentes a alterações pós- traducionais, tornando-as alvos de fosforilações, acetilação e glutationilação (GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005). Essas alterações têm, por desígnio, a regulação das propriedades dessa proteína, como sua exportação nuclear e sua ligação a S100A10, proteína com a qual forma um complexo heterotetramérico (KÖNIG et al., 1998; MADUREIRA; WAISMAN, 2013).

Estudos constataram que a ANXA2 apresenta expressão elevada em diversos tipos de neoplasias, incluindo aquelas que se originam na mama, fígado, próstata e pâncreas (MUSSUNOOR; MURRAY, 2008; LOKMAN et al., 2011). Considerando que tumores decorrem da desregulação de vias de sinalização celulares com alterações na atividade e/ou expressão de seus componentes proteicos (SOUZA et al., 2014), mecanismos relacionados à ANXA2 encontram-se, de fato, alterados na tumorigênese. Em um estudo anterior, foi avaliado o papel da ANXA2 no controle de vias de transdução de sinal ativadas por Ras e a via PI3K-AkT-mTOR (HAY; SONENBERG, 2004).

Assim como a mTOR, a ANXA2 está implicada em eventos fisiológicos-chave. A relação entre ANXA2 e a via mTOR tanto na ocorrência do câncer quanto em outras conjunturas, como a quimiorresistência, pode envolver a sinalização insulínica, mais precisamente o IGF1R. Portanto, caracterizar essa correlação torna-se importante no CM, sobretudo em seus subtipos mais agressivos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral: Definir o perfil transcricional dos genes *ANXA2* e *IGFR1* em linhagens celulares mamárias.

3.2 Objetivos específicos:

- Cultivar as linhagens celulares MCF-10A (não-tumorigênica); MCF7 (fenótipo luminal A) e MDA-MB231 (fenótipo triplo-negativa);
- Transcrever reversamente o mRNA gerando cDNAs passíveis de quantificação;
- Quantificar os transcritos referentes aos genes *ANXA2*, *IGFR1* e *ANXA1* nas diferentes linhagens;
- Correlacionar os transcritos com os subtipos moleculares de Câncer de Mama;
- Correlacionar a quantificação transcricional de *ANXA2* e *IGFR1* com a da *ANXA1*, conhecido marcador de CM triplo-negativo e
- Estabelecer um perfil característico para tumores triplo-negativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

Para a realização dos ensaios utilizou-se três linhagens de células mamárias, nomeadamente, MCF-10A (não tumorigênica), MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo basal). As respectivas linhagens foram mantidas em garrafas de cultura. No que concerne às células MCF7, estas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cutilab) enquanto as células MDA-MB231 foram cultivadas em meio Leibovitz (Cutilab), ambas suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina. As células MCF-10A foram cultivadas em meio DMEM F12 (Gibco), suplementadas com 10% de soro bovino fetal, 20 ng/mL de EGF, 0,5 µg/mL de hidrocortisona e 10 µg/mL de insulina. Posteriormente as células foram incubadas a 37°C. As linhagens MCF-10A e MCF7 foram mantidas em uma atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi efetuada em dias alternados até 80% de confluência para posterior utilização nos experimentos.

4.2 Extração de RNA

Efetuuou-se a extração do RNA total das linhagens celulares utilizando-se o Trizol Reagent® (Invitrogen), conforme as orientações do fabricante. A análise da qualidade do RNA total foi feita utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de agarose em conjunto à leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5 %, por 1 hora a 100 volts, empregando-se como tampão de corrida o TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com GelRed 1X e visualizado por luz ultravioleta (UV Transilumindor-*Molecular Imaging*, Loccus Biotecnologia). Realizados estes procedimentos, o RNA total foi armazenado à - 80°C para análises posteriores.

4.3 Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de Tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen). Completou-se o volume final de cada reação para 20 µl adicionando-se água tratada com DEPC. Posteriormente a solução foi incubada em termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos de modo a promover a desnaturação do híbrido RNA-cDNA, bem como a inativação da enzima MMLV-RT. Para verificar a presença de possíveis contaminantes exógenos reações controle foram preparadas. Realizados estes procedimentos, estocou-se o cDNA a -20°C para posterior amplificação.

4.4 PCR convencional para validação das amostras

A avaliação da qualidade do cDNA foi feita pela amplificação convencional do fragmento de 94 pb do gene constitutivo Beta-2-Microglobulin (*B2M*) flanqueado pelos oligonucleotídeos: 5' CCTGCCGTGTGAACCATGT 3' e 5' GCGGCATCTTCAAACCTCC 3'. Para a obtenção do amplicon foram utilizados reagentes nas seguintes concentrações: 1X *PCR buffer* (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) (Invitrogen), 200 uM de dNTPs (Invitrogen), 5 pmoles de *primers*, 1 U *Platinum®Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 2 uL de cDNA e água mili-Q, esta

última adicionada de modo a completar o volume final da reação para 20 uL. Após 28 ciclos (94°C por 40 s, 59°C por 40s, 72°C por 50s) em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), o produto da reação foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com GelRed1X.

4.5 Quantificação dos transcritos por qPCR

As quantificações relativas dos transcritos dos genes *ANXA2*, *IGFR1* e *ANXA1* foram obtidas após validação das curvas-padrão relativas. Para o gene *ANXA2* foram desenhados, utilizando o *software* Primer 3.0, os *primers* 5' TGACCAAGATGCTCGGGATC 3' e 5' CTTTCTGGAGGTGGGGCA 3' amplificando um fragmento de 113pb. Para *IGFR1* os *primers* 5' AAGGACTATGCCCCGAGAAG 3' e 5' GTCTGGACACACATTCTCGCT 3' flanquearam uma região de 105pb e para *ANXA1* foram utilizados os *primers* 5' GATTCAGATGCCAGGGCCT 3' e 5' CACTCTGCGAAGTTGTGGAT 3', gerando um *amplicon* de 110pb. Para os genes *ANXA2* e *ANXA1*, foi adotada a ciclagem universal em uma solução com 5uL do kit Sybr Green (Applied Biosystems) e 5pmol de cada iniciador para cada reação. Para o gene *IGFR1* foram aliquotados 4uL de Syber, 2,5pmol de cada *primer* e a temperatura e o tempo de anelamento foram alterados para 62 °C por 2 minutos. Os dados foram normalizados com as quantificações do gene de referência *B2M*. Os experimentos foram conduzidos em sextuplicatas e a detecção realizada no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems).

4.6 Análises Estatísticas

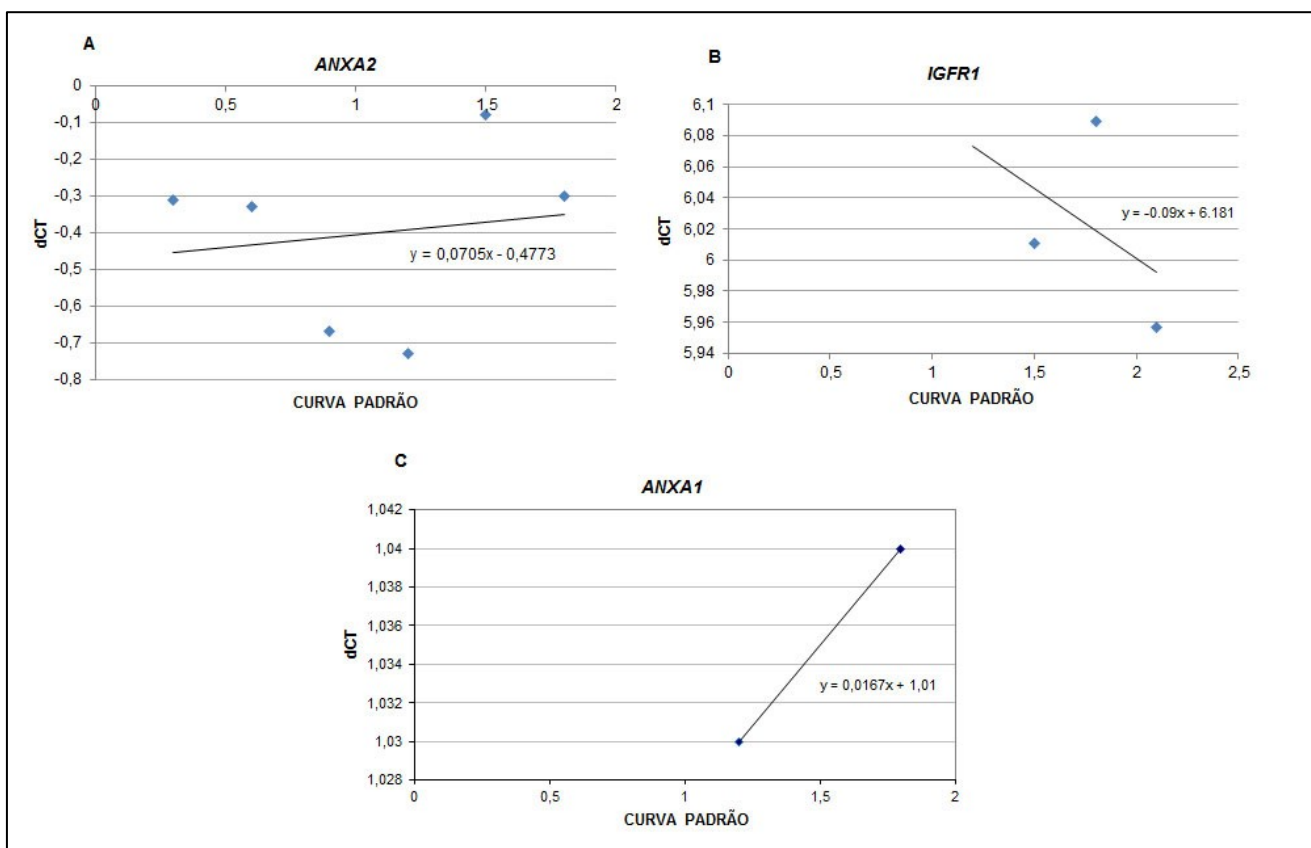
A análise dos resultados obtidos foi conduzida utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0. A normalidade dos dados foi avaliada e utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey para a comparação dos transcritos entre as linhagens estudadas. O teste de Pearson foi aplicado para avaliar as correlações entre os transcritos e sua significância calculada pelo teste t. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os transcritos dos genes *ANXA2* e *IGFRI* foram quantificados por qPCR pelo método Ct comparativo. Além disso, os níveis de mRNA do gene *ANXA1* foram avaliados, uma vez que este já foi descrito com um importante marcador no CMTN. Atualmente a qPCR é um dos métodos mais precisos para mensurar a expressão gênica, ao utilizar componentes fluorescentes (fluóforo) em um sistema de detecção e quantificação proporcional aos ciclos de amplificação (LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005; HAWKINS; GUEST, 2017; WITTEWER, 2017). A análise de expressão gênica (AEG) fornece informações importantes sobre a regulação dos mecanismos celulares em condições fisiológicas ou patológicas, o que permite identificar e quantificar mudanças no perfil de diferentes marcadores. A alteração nos níveis de mRNA em uma célula sujeita a qualquer mudança de suas condições basais permite correlacionar esse gene ao evento em estudo. Desse modo a utilização de qPCR para AEG promove uma maior compreensão do contexto patológico, uma vez que este método é extremamente sensível permitindo a detecção de pequenas oscilações na expressão gênica (GINZINGER, 2002; NESTOROV et al., 2013; CHAPMAN; WALDENSTRÖM, 2015; NUNES-XAVIER; PULIDO, 2016; SEGUNDO-VAL; SANZ-LOZANO, 2016). É válido ressaltar que um componente crítico de todo experimento de qPCR é a construção da curva padrão. Ao delinear os ensaios experimentais e otimizar as concentrações dos primers, a curva padrão é utilizada para determinar a eficiência, a sensibilidade, a reprodutibilidade e a faixa de trabalho do ensaio. Antecedendo à realização dos nossos experimentos baseados no método Ct comparativo, foi contruída a curva padrão relativa (Figura 03). Esta visa mostrar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência se equivalem (GREEN; SAMBROOK, 2018), o que se mostra essencial para a confiabilidade dos resultados.

Para os três genes alvo e para o gene de referência *B2M*, os *slopes* das curvas padrão foram próximos de -3,32, o que indica um aumento de 10 vezes do produto a cada 3,32 ciclos. Esses parâmetros equivalem a 100% de eficiência. O software realizou o cálculo da regressão linear fornecendo o R^2 que, para todos os genes, foi $\geq 0,97$. Os gráficos referentes aos genes *ANXA2* (Figura 3A), *IGFRI* (Figura 3B) e *ANXA1* (Figura 3C) foram gerados no Microsoft Excel® por regressão linear.

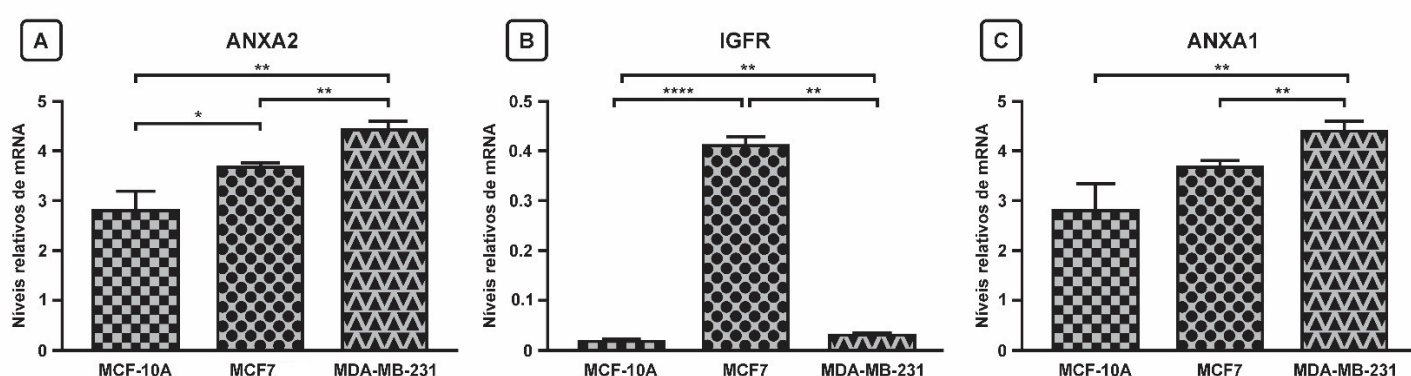
Figura 03. Curva padrão relativa para a validação do método Ct comparativo. Em (A) gráfico referente à regressão linear para o gene Anexina A2 (*ANXA2*). Em (B) gráfico referente à regressão linear para o gene Receptor do Fator de Crescimento semelhante à Insulina (*IGFR1*). Em (C) gráfico referente à regressão linear para o gene Anexina A1 (*ANXA1*). Em todas as análises o gene Beta-2-microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência.



dCt: Diferença entre o CT do gene alvo e o CT do gene de referência (CT alvo – CT referência).

Posteriormente, os transcritos foram quantificados em cada uma das linhagens mamárias MCF-10A (não-tumorigênica), MCF7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo basal triplo-negativo) (Figura 04). Observamos que o gene *ANXA2* foi significativamente mais expresso em células MDA-MB231 do que nas linhagens MCF-10A e MCF7 (1,2 vezes e 1,6 vezes mais expresso, respectivamente) (Figura 4A).

Figura 04. Quantificação relativa dos níveis dos transcritos dos genes Anexina A2 (*ANXA2*), Receptor do Fator de Crescimento semelhante à Insulina (*IGFRI*) e Anexina A1 (*ANXA1*) em linhagens celulares de câncer de mama por qPCR. Em (A) os níveis relativos de mRNA de *ANXA2* em (B) a quantificação correspondente ao *IGFRI* e em (C) os níveis transcricionais de *ANXA1*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ calculados pelo teste ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados estão apresentados como média $\pm$ DP de três experimentos independentes conduzidos em duplicata.



A princípio identificada como uma molécula intracelular, evidências indicam que a ANXA2 regula múltiplos eventos incluindo transdução de sinal, proliferação celular, diferenciação e apoptose, fusão de membrana, adesão celular, exocitose, endocitose e inflamação (HAJJAR; KRISHNAN, 1999; MOSS; MORGAN, 2004; SINGH, 2007; MONASTYRSKAYA; BABIYCHUK; DRAEGER, 2009). Nesse contexto, alterações em sua expressão têm sido relatadas no desenvolvimento, invasão, metástase e quimiorresistência do carcinoma hepatocelular, câncer pancreático, leucemia promielocítica aguda, câncer colorretal, carcinoma de células renais e CM (SINGH, 2007; ZHANG et al., 2012).

No que concerne ao CM, estudos anteriores relataram que a ANXA2 é superexpressa em pacientes com carcinoma ductal invasivo e *in situ*, se mostrando indetectável em células epiteliais ductais normais e hiperplásicas (SHARMA et al., 2006; CHAUDHARY et al., 2014). Além disso, a expressão de ANXA2 aumentou na superfície celular de acordo a agressividade do tumor mamário (SHETTY et al. 2012) e o tratamento com angiotensina inibiu a formação de metástases pulmonares bloqueando a ação da ANXA2 na formação de plasmina (SHARMA e SHARMA 2007). No nosso estudo verificamos a presença significativamente maior de transcritos de *ANXA2* em modelos celulares de CM, quando comparados com a linhagem MCF-10A. Portanto, mesmo sendo uma proteína modificada pós-traducionalmente (VALAPALA;

VISHWANATHA, 2011; SHETTY et al., 2012; BHARADWAJ et al., 2013, YUAN et al., 2017), as alterações em sua expressão já são detectadas em nível de mRNA, inclusive este sendo mais expresso no modelo triplo-negativo (MDA-MB231).

Definido molecularmente pela ausência de RE, RP e HER2, o CMTN representa de 15% a 20% de todos os casos de CM. Devido a sua natureza altamente agressiva com elevado índice de metástase de pacientes acometidos por esse subtipo, o CMTNs são geralmente considerados letais. As pacientes apresentam pior prognóstico com maior risco de recidiva, recorrência distante, elevado índice proliferativo e maior taxa de mortalidade (BASSEY-ARCHIBONG; 2017; ANGELINI et al., 2018; NARRANDES et al., 2018; PARK; AHN; KIM, 2018). Metástases viscerais são frequentes, relacionadas principalmente à órgãos críticos, como pulmão, fígado e cérebro (JITARIU et al., 2017; JHAN; ANDRECHEK, 2017; CAMORANI et al., 2018). O que torna esse subtipo preocupante é a ausência de marcadores específicos para o direcionamento terapêutico. Por não expressar RE, RP e HER2, os tratamentos com terapias hormonais (tamoxifeno) ou anti-HER2 são ineficazes. Dentro desse cenário a quimioterapia continua sendo o tratamento padrão para estes tumores. Em consequência, pesquisas atuais concentram-se na identificação de alvos genéticos (BASSEY-ARCHIBONG; 2017; JHAN; ANDRECHEK, 2017). Nossos resultados, portanto, se destacam ao apresentar um marcador com maior expressão em um modelo celular de CMTN, direcionando os estudos focados nesse subtipo.

Zhao e colaboradores (2003) demonstraram que a ANXA2 co-imunoprecipita com os receptores de insulina e do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 em células murinas, sugerindo que o receptor de insulina e suas vias compõem mecanismos moleculares associados à ANXA2. Os autores observaram que a inibição da fosforilação de IR e IGFR1 resultou em uma redução substancial de ANXA2 monomérica no meio de cultura. Além disso, identificaram sítios de fosforilação de tirosina (Tyr) localizados na porção N-terminal de ANXA2 suscetíveis à fosforilação por IR e IGFR1. Apesar de intrigante, a relação entre ANXA2 e IGFR1 ainda não foi elucidada no CM. Em nosso estudo, os níveis transcricionais de *IGFR1* também foram quantificados e se mostraram 21,5 vezes maiores em MCF7 quando comparados à MCF-10A e 14,3 vezes maiores em MCF7 em relação às células MDA-MB231 (Figura 4B). Contudo, não houve correlação entre as quantificações de *ANXA2* e *IGFR1*.

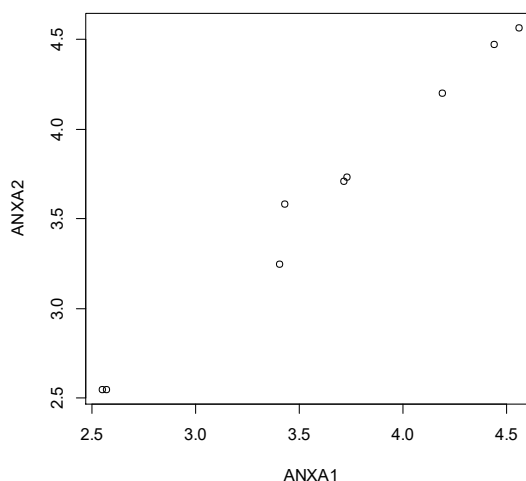
Dados da literatura relatam que tumores mamários positivos ao RE frequentemente apresentam níveis elevados de IGF1R (BARTUCCI et al., 2001; YERUSHALMI, 2012). As células MCF7 expressam RE, RP e E-caderina, enquanto células MDA-MB231 e MCF-10A possuem status triplo-negativo, não apresentando RE (SARFSTEIN et al., 2012; MORIMOTO-

KAMATA; YUI, 2017). Além disso, evidências sugerem um papel central da sinalização de IGFR1 na transformação maligna (KARAMOUZIS; PAPAVASSILIOU, 2012; SOLOMON-ZEMLER; SARFSTEIN; WERNER, 2017) e uma maior expressão de seus transcritos, detectadas no presente estudo, evidenciam seu papel na metamorfose oncogênica. Nesse contexto, o IGFR1 emerge como uma nova possibilidade para abordagem terapêutica de CM luminais, uma vez que nem todas as pacientes são positivamente responsivas ou resistem aos tratamentos disponíveis para esses subtipos, como a hormonioterapia.

Segundo Wang e colaboradores (2015) a superexpressão de ANXA2 também se encontra diretamente associada com a metástase no CM e com marcadores de transição epitélio-mesenquimal (EMT), correlacionando-se com menores níveis de E-caderina e com a ativação de STAT3. Gibbs e Vishwanatha (2017) também verificaram uma maior expressão de ANXA1 e ANXA2 em pacientes diagnosticados com CM triplo-negativo, sendo marcadores de pior prognóstico. Nós também quantificamos maiores níveis de transcritos de *ANXA1* na linhagem MDA-MB231 ($P < 0,05$) (Figura 4C). Estudos anteriores demonstraram que, assim como ANXA2, a ANXA1 se mostra pleiotrópica, regulando diferentes processos como proliferação, diferenciação, apoptose e transporte de membrana (SAKAGUCHI et al., 2007; ÁLVAREZ-TEIJEIRO et al., 2017). Caracterizada como uma proteína de ligação a fosfolipídios de forma cálcio dependente, a ANXA1 é uma proteína antiinflamatória descrita como desregulada no CM, notadamente nos CMTNs (BHARDWAJ et al., 2015). Em análises de imunocitoquímica e western-blottin em células MDA-MB-231, Okano e colaboradores (2015) observaram intensa marcação citoplasmática, além de elevados níveis transcricionais quantificados por qPCR. Outros trabalhos também relataram maiores níveis de expressão de ANXA1 em células MDA-MB-231 e demonstraram sua atuação no CMTN mediante interação com outros componentes celulares como receptores de peptídeos formílicos (FPRs) e Catepsina D (VECCHI et al., 2018; ZOIA et al., 2019).

Ademais, nossos resultados também demonstraram um perfil de expressão similar entre *ANXA2* e *ANXA1*, os quais se correlacionaram positivamente ($R = 0.99$; $P = 3.79 \times 10^{-8}$) (Figura 05). De fato, dados já publicados sugerem que as duas proteínas atuam de forma sinérgica na progressão do CM (GRAAUW et al., 2010; MASCHLER et al., 2010; GIBBS; VISHWANATHA, 2018). Contudo, estudos funcionais como silenciamento gênico, análise da expressão endógena de vias relevantes são necessários para a validação desse sinergismo no CMTN.

Figura 05: Correlação de Pearson entre os transcritos dos genes Anexina A2 (*ANXA2*) e Anexina A1 (*ANXA1*). Pelo teste t, existe uma correlação positiva entre as variáveis ($R = 0,99$, $P=3,79e-08$).



6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a expressão transcricional de *ANXA2* é significativamente maior em células MDA-MB231 (fenótipo basal triplo-negativo) em relação as demais linhagens (MCF-10A e MCF7). Observamos que a expressão de *IGFR1* se mostrou significativamente maior na linhagem MCF7 (fenótipo luminal), não correlacionando com a de *ANXA2*. Verificamos também uma correlação positiva entre a expressão transcricional de *ANXA2* e *ANXA1*. Nossos resultados sugerem o potencial de *IGFR1* como alvo para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras para os tumores luminais e a *ANXA2* para tumores TN. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender o sinergismo desses marcadores, sobretudo no CMTN.

REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, A. et al. Proteins Involved in HER2 Signalling Pathway, Their Relations and Influence on Metastasis-Free Survival in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab in Adjuvant Setting. **J Cancer**, v. 8, n. 1, p. 131-139, jan. 2017.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 83, n. 1-5, p. 113-118, dez, 2002.

AGOULNIK, I. U. et al. INPP4B: the new kid on the PI3K block. **Oncotarget**, v. 2, n. 4, p. 321-328, abr. 2011.

ALCALÁ-CORONA, S. A. et al. Network Modularity in Breast Cancer Molecular Subtypes. **Front Physiol**, v. 8, n. 915, p. 1-14, nov. 2017.

ALISON, K. H. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. **Am J Clin Pathol**, v. 138, n. 6, p. 770-780, dez, 2012.

ÁLVAREZ-TEIJEIRO, S. et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck squamous cell carcinoma is mediated via transcriptional control with direct involvement of miR-196a/b. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

ANASTÁCIO, F. M. V. **Estudo do papel desempenhado pela proteína anexina A2 na regulação de vias de transdução de sinal ativadas por Ras**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em biologia molecular e microbiana) – Universidade do Algarve, Faro (Portugal), 2015.

ANDERSON, G. L.; CHLEBOWSKI, R. T. The Influence of Time From Menopause and Mammography on Hormone Therapy–Related Breast Cancer Risk Assessment. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n.4, p. 284-285, fev. 2011.

ANGELINI, G. et al. Magnetic resonance (MR) features in triple negative breast cancer (TNBC) vs receptor positive cancer (nTNBC). **Clinical Imaging**, v. 49, p. 12-16, mai. 2018.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **MCF10A (ATCC® CRL-10317™)**. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx> > Acesso em 02 jun. 2019.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **MCF7 (ATCC® HTB-22™)**. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#characteristics> > Acesso em 02 jun. 2019.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)**. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#characteristics> > Acesso em 04 jun. 2019.

BARTUCCI, M. ET al. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 61, n.18, p. 6747-54, set. 2001.

BASSEY-ARCHIBONG, B. et al. Kaiso is highly expressed in TNBC tissues of women of African ancestry compared to Caucasian women. **Cancer Causes & Control**, v. 28, n. 11, p. 1295-1304, nov. 2017.

BAUMGARD, L. H.; HAUSMAN, G. J.; SANZ FERNANDEZ, M. V. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. **Domest Anim Endocrinol**, v. 54, p. 76-84, jan. 2016.

BAYRAKTAR, S.; GLÜCK, S. Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 138, n. 1, p. 21-35, fev. 2013.

BELL, R.; BARRACLOUGH, R.; VASIEVA, O. Gene Expression Meta-Analysis of Potential Metastatic Breast Cancer Markers. **Current Molecular Medicine**, v. 17, n. 3, 2017.

BELLACOSA, A. et al. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n.3, p. 268-275, mar. 2004.

BENJAMIN, D. et al. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 11, p. 868-880, out. 2011.

BERTOS, N. R.; PARK, M. Breast cancer - one term, many entities? **J Clin Invest**, v. 121. N. 10, p. 3789-3796, out. 2011.

BERTUCCI, F. et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 20, p. 2981-2991, dez. 2000.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONCALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 1772-1786, mai. 2006.

BEUVINK, I. et al. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 747-759, mar. 2005.

BHARDWAJ, A. et al. Annexin A1 Preferentially Predicts Poor Prognosis of Basal-Like Breast Cancer Patients by Activating mTOR-S6 Signaling. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-19, mai. 2015.

BIGLIA, N. et al. Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment. **Endocr Relat Cancer**, v. 14, n. 3, p. 549-567, set. 2007.

BIRNBAUM, D. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **Int J Oncol**, v. 25, n. 2, p. 249-258, ago. 2004.

BOETES, C. et al. Breast tumors: comparative accuracy of MR imaging relative to mammography and US for demonstrating. **Radiology**, v. 197, n. 3, p. 743-747, dez. 1995.

BRANGE, J. et al. Toward understanding insulin fibrillation. **J Pharm Sci**, v. 86, n. 5, p. 517-525, mai. 1997.

BRAUNSTEIN, S. et al. Regulation of protein synthesis by ionizing radiation. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 21, p. 5645-5656, nov. 2009.

BROWNING, K. S. et al. Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. **Trends Biochem Sci**, v. 26, n. 5, p. 284, mai. 2001.

BUDANOV, A. V; KARIN, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. **Cell**, v. 134, n. 3, p. 451-460, ago. 2008.

BURGER, A. et al. The crystal structure and ion channel activity of human annexin 2, a peripheral membrane protein. **J. Mol. Biol**, v. 257, n. 4, p. 839-847, abr. 1996.

BURKE, J. E. et al. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamics events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 38, p. 15259-15264, set. 2012.

CAI, S. et al. Effect of mulberry leaf (Folium Mori) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. **Pharm Biol**, v. 54, n. 11, p. 2685-2691, nov. 2016.

CAM, M. et al. p53/TAp63 and AKT regulate mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling through two independent parallel pathways in the presence of DNA damage. **J Biol Chem**, v. 289, n. 7, p. 4083-4094, fev. 2014.

CAMARGO, E. A. De. **Efeitos genotóxicos e mutagênicos dos agentes antineoplásicos cisplatina e gencitabina em células de carcinoma de bexiga**. 2010. 74 f. Trabalho de pós-graduação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CAMORANI, S. et al. TNBC Challenge: Oligonucleotide Aptamers for New Imaging and Therapy Modalities. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 1-21, nov. 2018.

CASTANEDA, C. A. et al. The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 4, p. 751-759, dez. 2010.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B; KLUMB, C. E; MAIA, R. C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, ago. 2002.

CHAPMAN, J.; WALDENSTRÖM, J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0141853, nov. 2015.

CHAUDHARY, P. et al. Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies. **Br J Cancer**, v. 111, n. 12, p. 2328-2341, dez. 2014.

CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-750, mai. 2009.

CHEN, Y. C.; HUNTER, D.J. Molecular epidemiology of cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n. 1, p. 45-57, jan-fev. 2005.

CHO, J. M. et al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett**, v. 260, n. 1-2, p. 96-108, fev. 2008.

CHOI, J. et al. *Gelidium elegans* Extract Ameliorates Type 2 Diabetes via Regulation of MAPK and PI3K/Akt Signaling. **Nutrients**, v. 10, n. 1, p. 1-14, jan. 2018.

CHOI, J. H. et al. Molecular modeling of the misfolded insulin subunit and amyloid fibril. **Biophys J**, v. 97, n. 12, p. 3187-3195, dez. 2009.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-616, nov. 2004.

CLARK, G. B. et al. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New Phytol*, v. 196, n. 3, p. 695-712, nov. 2012.

COMŞA, S.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Res**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, jun. 2015.

CONCEIÇÃO, A. L. **Caracterização estrutural de tecidos mamários normais e neoplásicos através de espalhamento de raios X**. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CONSTANTINIDOU, A.; SMITH, I. Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer? **Breast**, v. 20, n. 3, p. 158-161, out. 2011.

CORNU, M; ALBERT, V; HALL, M. N. mTOR in aging, metabolism, and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 23, n. 1, p. 53-62, fev. 2013.

DANCEY, J. mTOR signaling and drug development in cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 4, p. 209-219, abr. 2010.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

DAWSON, P.; BLOMLEY, M. Gadolinium chelate MR contrast agents. **Clin Radiol**, v. 49, n. 7, p. 439-442, jul. 1994.

DE BROT, M. et al. Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 5, p. 529-534, set. 2009.

DELMANTO, A. **Avaliação do tecido mamário em mulheres na pós-menopausa usuárias de isoflavona da soja**. 2012. 84 f. Tese (Doutorado em tocoginecologia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

DENDULURI, S. K. et al. **Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance**. **Genes Dis**, v. 2, n. 1, p. 13-25, mar. 2015.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 15, p. 4429-4434, ago. 2007.

DILLING, M. B. et al. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. **Cancer Res**, v. 54, n. 4, p. 903-907, fev. 1994.

DONEPUDI, M. et al. Breast cancer statistics and markers. **J Cancer Res Ther**, v. 10, n. 3, p. 506-11, 2014.

DOWLING, R. J. et al. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1804, n. 3, p. 433-439, mar. 2010.

DUFRANE, D.; NENQUIN, M.; HENQUIN, J. C. Nutrient control of insulin secretion in perfused adult pig islets. **Diabetes Metab**, v. 33, n. 6, p. 430-438, dez. 2007.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? **Journal Cell Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 208-221, jan-mar. 2005.

ELLSWORTH, R. E. et al. Correlation of levels and patterns of genomic instability with histological grading of DCIS. **Ann Surg Oncol**, v. 14, n. 11, p. 3070-3077, nov. 2007.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606-619, ago. 2006.

ESTELLER, M. et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 7, p. 564-569, abr. 2000.

EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES. **Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424). 2017.** Disponível em: < <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf> > Acesso em: 04 jun. 2019.

EVANS, T. C.; NELSESTUEN, G. L. Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. **Biochemistry**, v. 33, n. 45, p. 13231-13238, nov. 1994.

FACCHINETTI, V. et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. **Embo J**, v. 27, n. 14, p. 1932-1943, jul. 2008.

FAN, C. et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **N Engl J Med**, v. 355, n. 6, p. 560-569, ago. 2006.

FINDLAY, G. M. et al. Interaction domains of Sos1/Grb2 are finely tuned for cooperative control of embryonic stem cell fate. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1008-1020, fev. 2013.

FRIAS, M. A. et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. **Curr Biol**, v. 16, n. 18, p. 1865-1870, set. 2006.

FULFORD, L. G. et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. **Breast Cancer Res**, v. 9, n. 1, p. 1-11, jan. 2007.

GANLEY, I. G. et al. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **J Biol Chem**, v. 284, n. 18, p. 12297-12305, mai. 2009.

GARAMI, A. et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. **Mol Cell**, v. 11, n. 6, p. 1457-1466, jun. 2003.

GARAMI, A. et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. **Mol Cell**, v. 11, n. 6, p. 1457-1466, jun. 2003.

GERKE, V.; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 449-461, jun. 2005.

GEWINNER, C. et al. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. **Cancer cell**, v. 16, n. 2, p. 115-125, ago. 2009.

GIBBS, L. D.; VISHWANATHA, J. K. Prognostic impact of AnxA1 and AnxA2 gene expression in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2697-2704, dez. 2017.

GINZINGER, D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GIOVANNUCCI, E. et al. Diabetes and cancer: a consensus report. **Diabetes Care**, v. 33, n.7, p. 1674-1685, jul. 2010.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol**, v. 24, n. 9, p. 2206-2223. ago, 2013.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, jun. 2011.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. Constructing a Standard Curve for Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experiments. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 10, 2018.

GU, G.; DUSTIN, D.; FUQUA, S. A. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. **Curr Opin Pharmacol**, v. 31, p. 97-103, dez. 2016.

GUERREO-ZOTANO, A; MAYER, I. A; ARTEAGA, C. L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. **Cancer Metastasis Rev**, v. 35, n. 4, p. 515-524, dez. 2016.

GUERTIN, D. A. et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. **Dev Cell**, v. 11, n. 6, p. 859-871, dez. 2006.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the Role of mTOR in Cancer. **Cancer Cell**, v. 12, n. 1, p. 9-22, jul. 2007.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the Role of mTOR in Cancer. **Cancer Cell**, v. 12, n. 1, p. 9-22, jul. 2007.

HAJJAR, K. A.; KRISHNAN, S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. **Trends Cardiovasc Med**, v. 9, n. 5, p. 128-138, jul. 1999.

HALL, J. M. et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1684-1689, dez. 1990.

HAMMERL, D. et al. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, p. 178-188, 2018.

HAO, Y. et al. Gain of interaction with IRS1 by p110 α -helical domain mutants is crucial for their oncogenic functions. **Cancer Cell**, v. 23, n. 5, p. 583-593, mai. 2013.

HAQUE, R. et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 21, n. 10, p. 1848-1855, out. 2012.

HARA, K. et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 177-189, jul. 2007.

HARDIE, D. G. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 5, p. 1-16, mai. 2012.

HASHMI, A. A. et al. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. **World J Surg Oncol**, v. 16, n. 1, p. 12957-12963, jan. 2018.

HAUPT, B.; RO, J. Y.; SCHWARTZ, M. R. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. **Arch Pathol Lab Med**, v.134, n. 1, p. 130-133, jan. 2010.

HAWKINS, S. F.; GUEST, P.C. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. **Methods Mol Biol**, v. 1546, p. 125-133, 2017.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, v. 18, n. 16, p. 1926-1945, ago. 2004.

HAY, N; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, v. 18, n. 16, p. 1926-1945, ago. 2004.

HEITMAN, J.; MOVVA N. R.; HALL M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 905-909, ago. 1991.

HERSCHKOWITZ, J. L. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. 1-17, maio. 2007.

HEYWANG, S.H.; SCHREER, I.D.; ERSHAW, D.D. Diagnostic breast imaging. Stuttgart New York: **Thieme**, 1997.

HICKS, D. G. et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n. 9, p. 1097-1104, set. 2006.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 4, p. 1-7, ago. 2011.

HOLZ, M. K. The role of S6K1 in ER-positive breast cancer. **Cell Cycle**, v. 11, n. 17, p. 3159-3165, set. 2012.

HORTON, J. D. GOLDSTEIN, J. L. BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1125-1131, mai. 2002.

HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 7, p. 1981-1991, abr. 2009.

HU, Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 7, n. 96, abr. 2006.

HUANG, C. H. et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1744-1748, dez. 2007.

HUDIS, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. **N Engl J Med**, v. 357, n. 1, p. 39-51, jul. 2007.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, n.1, p. 103-116, fev. 2001.

IKENOUE, T. et al. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. **Embo J**, v. 27, n. 14, p. 1919-1931, jul. 2008.

IKINK, G. J. et al. IRS4 induces mammary tumorigenesis and confers resistance to HER2-targeted therapy through constitutive PI3K/AKT-pathway hyperactivation. **Nat Commun**, v. 7, n. 13567, p. 1-15, nov. 2016.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, v. 115, n. 5, p. 577-590, nov. 2003.

INOKI, K; CORRADETTI, M. N; GUAN, K. L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. **Nat Genet**, v. 37, n.1, p. 19-24, jan. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Controle do câncer de mama. 2016.** Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/conceito_magnitude> Acesso em: 15 abr. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O Câncer de mama. 2014.** Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/outubro-rosa/2015/cancer-de-mama.asp> > Acesso em: 13 abr. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O Câncer de mama. 2018.** Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acesso em: 13 jun. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Perguntas e respostas sobre o câncer. 2004.** Disponível em:< http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=83> Acesso em: 12 abr. 2018.

IRVIN, W. J. Jr.; CAREY, L. A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-2805, dez. 2008.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the action cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 1122-1128, nov. 2004.

JHAN, J.; ANDRECHEK, E. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. **Pharmacogenomics**, v. 18, n. 17, p. 1595-1609, nov. 2017.

JIANG, H.; RUGO, H. S. Human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+) metastatic breast cancer: how the latest results are improving therapeutic options. **Ther Adv Med Oncol**, v. 7, n. 6, p. 321-339, nov. 2015.

JITARIU, A. et al. Triple negative breast cancer: the kiss of death. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, p. 46652-46662, jul. 2017.

JOHNSTONE S. A.; HUBAISHY, I.; WAISMAN, D. A. Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. **J Biol Chem**, v. 267, n. 36, p. 25976-25981, dez. 1992.

KAGAWA, S. et al. AKt/mTOR signaling pathway is crucial for gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. **J Surg Res**, v. 178, n. 2, p. 758-767, dez. 2012.

KAIZUKA, T. et al. Tti1 and Tel2 Are Critical Factors in Mammalian Target of Rapamycin Complex Assembly. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 20109-20116, jun. 2010.

KAKU, Y. et al. Dipalmitoleoyl-phosphatidylethanolamine Induces Apoptosis of NCI-H28 Malignant Mesothelioma Cells. **Anticancer Res**, v. 34, n. 4, p. 1759-1764, abr. 2014.

KAMADA, Y. et al. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 16, p. 7239-7248, ago. 2005.

KAMADA, Y. et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. **J Cell Biol**, v.150, n. 6, p. 1507-1513, set. 2000.

KANG, S; BADER, A. G; VOGT, P. K. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n.3, p 802-807, jan. 2005.

KARAMOUZIS, M.; PAPAVASSILIOU, A. Targeting insulin-like growth factor in breast cancer therapeutics. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 84, n. 1, p. 8-17, out. 2012.

KARGER, S.; FREIBURG, G. H. Pathologists' Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Breast Care (Basel)**, v. 5, n. 3, p. 185-187, jun. 2010.

KATO, S. et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, v. 270, n. 5241, p. 1491-1494, dez. 1995.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2003. 842 p.

KENERSON, H. L. et al. Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. **Cancer res**, v. 62, n 20, p. 5645-5650, out. 2002.

KENNECKE, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3271-3277, jul. 2010.

KERR, P.; ASHWORTH, A. New complexities for BRCA1 and BRCA2. **Curr Biol**, v. 11, n. 16, p. 668-676, ago. 2001.

KEY, T.J. Serum oestradiol and breast cancer risk. **Endocr RelatCancer**, v. 6, n. 2, p. 175-180, jun. 1999.

KHORAMI, S. A. H. et al. PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. **Annals of medical and biomedical sciences**, v. 1, n. 2, p. 46-55. Out. 2015.

KIM, D. H. et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-175, jul. 2002.

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, out. 2012.

KÖNIG, J. et al. The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 273, n. 31, p. 19679-19684, jul. 1998.

KRISTOFFERSEN, E. K.; MATRE, R. Surface annexin II on placental membranes of the fetomaternal interface. **Am J Reprod Immunol**, v. 36, n. 3, p. 141-149, set. 1996.

KUMAR, M. et al. BRCA1 Promoter Methylation and Expression - Associations with ER+, PR+ and HER2+ Subtypes of Breast Carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 18, n. 12, p. 3293-3299, dez. 2017.

KUROSE, K. et al. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. **Nat Genet**, v. 32, n. 3, p. 355-357, nov. 2002.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 20, p. 3589-3594, out. 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-293, abr. 2012.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v. 6, n. 62, p. 1-16, mar. 2005.

LAURING, J; PARK, B. H; WOLFF, A. C. The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 11, n. 6, p. 670-678, jun. 2013.

LEVIN, E. R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. **Mol Endocrinol**, v. 19, n.8, p. 1951-1959, ago. 2005.

LEVITT, N.C.; HICKSON, I. D. Caretaker tumor suppressor genes that defend genome integrity. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 4, p. 179-186, abr. 2002.

LEWIS-JONES, H. G.; WHITEHOUSE, G. H.; LEINSTER, S. J. The role of magnetic resonance imaging in the assessment of local recurrent breast carcinoma. **Clin Radiol**, v.43, n.3, p. 197-204, mar. 1991.

LI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 8, p. 3441-3446, fev. 2010.

LOEWHITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177-1201, dez. 2011.

LOKMAN, N. A. et al. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. **Cancer Microenviron**, v. 4, n. 2, p. 199-208, ago. 2011.

LUECKE, H. et al. Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature*, v. 378, n. 6556, p. 512-515, nov. 1995.

MABUCH, S. et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, v. 137, n. 1, p. 173-179, abr. 2015.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, v. 10, n. 1, p. 81-93, fev. 2000.

MADUREIRA, P. A. et al. Annexin A2 is a novel Cellular Redox Regulatory Protein involved in Tumorigenesis. *Oncotarget*, v. 2, n. 12, p. 1075-1093, dez. 2011.

MADUREIRA, P. A.; WAISMAN, D. M. Annexin A2: The importance of being redox sensitive. *Int J Mol Sci*, v. 14, n. 2, p. 3568-3594, fev. 2013.

MAJI, S. et al. Exosomal Annexin A2 Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res*, v. 15, n.1, p. 93-105, jan. 2017.

MANNING, B. D. Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol*, v. 167, n. 3, p. 399-403, nov. 2004.

MANNING, B. D. Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol*, v. 167, n. 3, p. 399-403, nov. 2004.

MARTINS, C. A. et al. Evolução da mortalidade por câncer de mama em mulheres jovens: desafios para uma política de atenção oncológica. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 59, n. 3, p. 341-349, jul. 2013.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 7, n. 12, p. 961-967, dez. 2007.

MATOS, I. et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*, v. 447, n. 4, p. 688-694, out. 2005.

MAYER, I. A; ARTEAGA, C. L. PIK3CA activating mutations: a discordant role in early versus advanced hormone-dependent estrogen receptor-positive breast cancer? *J Clin Oncol*, v. 32, n. 27, p. 2932-2934, set. 2014.

MCDONALD, C. B. et al. Grb2 adaptor undergoes conformational change upon dimerization. **Arch Biochem Biophys**, v. 475, n. 1, p. 25-35, jul. 2008.

MCLENDON, R. et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-1068, out. 2008.

MENDES, T. F. S. et al. Triple Negative Breast Cancer: Nanosolutions for a Big Challenge. **Advanced Science**, v. 2, n. 11, p. 1-14, nov. 2015.

MENSE, S. M. et al. Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 232, n. 1, p. 78-85, out. 2008.

METZGER-FILHO, O. et al. Patterns of Recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 25, p. 3083-3090, set. 2013.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, out. 1994.

MONASTYRSKAYA, K.; BABIYCHUK, E. B.; DRAEGER, A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 16, p. 2623-2642, ago. 2009.

MORIMOTO-KAMATA, R.; YUI, S. Insulin-like growth factor-1 signaling is responsible for cathepsin G-induced aggregation of breast cancer MCF-7 cells. **Cancer Science**, v. 108, n. 8, p. 1574-1583, ago. 2017.

MOSS, S. E.; MORGAN, R. O. The annexins. **Genome Biol**, v. 5, n. 4, p. 219, mar. 2004.

MOTA, A. L. et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. **Oncol Lett**, v. 13, n. 6, p. 4708-4712, jun. 2017.

MUMTAZ, H. et al. Comparison of magnetic resonance imaging and conventional triple assessment in locally recurrent breast cancer. **Br J Surg**, v. 84, n. 8, p. 1147-1151, ago. 1997.

MUSSUNOOR, S.; MURRAY, G. I. The role of annexins in tumour development and progression. **J Pathol**, v. 216, n. 2, p. 131-140, out. 2008.

MYBURGH, E. J. et al. Clinical Overestimation of HER2 Positivity in Early Estrogen and Progesterone Receptor-Positive Breast Cancer and the Value of Molecular Subtyping Using BluePrint. **J Glob Oncol**, v. 3, n. 4, p. 314-322, nov. 2016.

NAHTA, R.; HUNG, M. C.; ESTEVA, F. J. The HER-2 targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 1, p. 2343-2346, abr. 2004.

NAKADA, M. et al. Aberrant signaling pathways in glioma. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 3242-3278, ago. 2011.

NAROD, S.A.; FOULKES, W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 9, p. 665-676, set. 2004.

NARRANDES, S. et al. The exploration of contrasting pathways in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, jan. 2018.

NASCIMENTO, F. B. do.; PITTA, M. G. da R.; REGO, M. J. B. de M. Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo. **Arq Med**, Porto, v. 29, n. 6, p. 153-159, dez. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 965 p.

NEPSTAD, I. et al. Resistance to the Antiproliferative In Vitro Effect of PI3K-Akt-mTOR Inhibition in Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells Is Associated with Altered Cell Metabolism. **Int J Mol Sci**, v.19, n. 2, p. 1-18, jan. 2018.

NESTOROV, J. et al. Gene Expression Studies: How to Obtain Accurate and Reliable Data by Quantitative Real-Time RT PCR. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 32, n. 4, p. 325-338, 2013.

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. 3. ed. University of Rochester School of Medicine and Dentistry Rochester New York: Artmed, 2004.

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 16, p. 5367-5374, ago, 2004.

NOBREGA, F. L. et al. Screening and characterization of novel specific peptides targeting MDA-MB-231 claudin-low breast carcinoma by computer-aided phage display methodologies. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1-14. Nov. 2016.

NUNES-XAVIER, C.E.; PULIDO, R. Global RT-PCR and RT-qPCR Analysis of the mRNA Expression of the Human PTPome. **Methods Mol Biol**, v. 1447, p. 25-37, 2016.

OKANO, M. et al. Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 3, p. 1064-1070, mar. 2015.

OLIVEIRA, N. C. dos S. Análise **proteômica comparativa do carcinoma mamário lobular e ductal**. 2011. 150 f. Dissertação (Mestrado em genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 27, p. 2817-2826, dez. 2004.

PARK, J.; AHN, J.; KIM, S. How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): from the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. **ESMO Open**, v. 3, n. Suppl 1, p. 1-16, mai. 2018.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. **Eur J Cancer**, v. 37, n. 8, p. 4-66, out. 2001.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, ago. 2000.

PHUNG, T. L. et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. **Cancer cell**, v. 10, n. 12, p. 159-170, ago. 2006.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol**, v. 4, n. 64, p.1-11, abr. 2014.

PORTER, H. A.; CAREY, G. B.; E KEEGAN, A. D. Insulin receptor substrate 1 expression enhances the sensitivity of 32D cells to chemotherapy-induced cell death. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 14, p. 1745-1758, ago. 2012.

POTTER, C. J.; PEDRAZA, L. G.; XU, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 9, p. 658-665, set, 2002.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v. 24, n. 2, p. 26-35, nov. 2015.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. 1-18, set. 2010.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol**, v. 5, n. 1, p. 5-23, fev. 2011.

QU, Y. et al. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. **PLoS One**, v.10, n. 7, p.1-16, jul. 2015.

RABIK, C. A; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agentes. **Cancer Treat Rev**, v. 33, n. 1, p. 9-23, fev. 2007.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 6, p. 383-396, 2003.

RAHMAWATI, Y. et al. Molecular Subtypes of Indonesian Breast Carcinomas - Lack of Association with Patient Age and Tumor Size. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 19, n. 1, p. 161-166, jan. 2018.

RAKHA, E. A; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast câncer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 2, p. 293-308, abr. 2010.

RAMIREZ, A. G. et al. Breast cancer screening in regional Hispanic populations. **Health Educ Res**, v. 15, n. 5, p. 559-568, out. 2000.

RAUGHT, B. et al. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. **Embo J**, v. 19, n. 3, p. 434-444, fev. 2000.

RENOIR, J. M.; MARSAUD, V.; LAZENNEC, G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 4, p. 449-465, fev. 2013.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--Unique membrane binding proteins with diverse functions. *J.Cell Sci*, v. 13, n. 117, p. 2631-2639, jun. 2004.

RICHTER, J. D.; SONENBERG, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, v. 433, n. 7025, p. 477-480, fev. 2005.

RIEBER, A et al. Value of MR mammography in the detection and exclusion of recurrent breast carcinoma. *J Comput Assist Tomogr*, v. 21, n. 5, p. 780-784, set-out. 1997.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*, v. 183, n. 4, p. 1113-1124, out. 2013.

RODRIGUES, J. D; CRUZ, M. S; PAIXAO, A.N. Uma análise da prevenção do câncer de mama no Brasil. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 10, p. 3163-3176, Out. 2015.

ROJAS, J. M.; OLIVA, J. L.; SANTOS, E. Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes Cancer*, v. 2, n. 3, p. 298-305, mar. 2011.

ROSENTHAL, T. C.; PUCK, S. M. Screening for genetic risk of breast cancer. *Am Fam Physician*, v. 59, n.1, p. 99-104, jan. 1999.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, v. 11, n. 16, p.5678-5685, ago. 2005.

SAKAGUCHI, M. et al. Truncation of Annexin A1 Is a Regulatory Lever for Linking Epidermal Growth Factor Signaling with Cytosolic Phospholipase A2 in Normal and Malignant Squamous Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 49, p. 35679-35686, dez. 2007.

SALMENA, L. CARRACEDO, A. PANDOLFI, P. P. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell*, v. 133, n. 3, p. 403-414, mai. 2008.

SANCAK, Y. et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, v. 25, n. 6, p. 903-915, mar. 2007.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, fev. 2005.

SARBASSOV, D. D. et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. **Mol cell**, v. 22, n. 2, p. 159-168, abr. 2006.

SARBASSOV, D. D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol**, v. 14, n. 14, p. 1296-1302, jul. 2004.

SARFSTEIN, R. et al. Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) Translocates to Nucleus and Autoregulates IGF-IR Gene Expression in Breast Cancer Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2766-2776, jan. 2012.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253-262, out. 2000.

SCHMIDT, A. et al. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 531-542, fev. 1997.

SEGUNDO-VAL, I. S.; SANZ-LOZANO, C. S. Introduction to the Gene Expression Analysis. **Methods Mol Biol**, v. 1434, p. 29-43, 2016.

SELVARAJAH, J. et al. DNA damage-induced S and G2/M cell cycle arrest requires mTORC2-dependent regulation of Chk1. **Oncotarget**, v. 6, n. 1, p. 427-440, jan. 2015.

SHARMA, M. R. et al. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. **Exp Mol Pathol**, v. 81, n. 2, p. 146-156, out. 2006.

SHARMA, M. C; SHARMA, M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. **Curr Pharm Des**, v.13, n. 35, p. 3568-3575, 2007.

SHAW, R. J; CANTLEY; L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth, **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 424-230, mai. 2006.

SHEN, C et al. Regulation of FANCD2 by the mTOR pathway contributes to the resistance of cancer cells to DNA double-strand breaks. **Cancer Res**, v. 73, n. 11, p. 3393-3401, jun. 2013.

SHETTY, P. K. et al. Reciprocal regulation of annexin A2 and EGFR with Her-2 in Her-2 negative and herceptin-resistant breast cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. 1-13, set. 2012.

SIDDLE, K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. **J Mol Endocrinol**, v. 47, n. 1, p. 1-10, jun. 2011.

SIGMA-ALDRICH. **MCF7 Cell Line human**. Disponível em: <
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_86012803?lang=pt&region=BR&gclid=EAIaIQobChMI2L36-bjO4gIVhZ-zCh1TugHMEAAYASAAEgLG6vD_BwE > Acesso em 02 jun. 2019.

SILVERA, D. et al. mTORC1 and 2 coordinate transcriptional and translational reprogramming in resistance to DNA damage and replicative stress in breast cancer cells. **Mol Cell Biol**, v. 37, n. 5, fev. 2017.

SIMÃO, T. A. et al. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. **Int J Cancer**, v. 101, n. 1, p. 69-73, set. 2002.

SINGH, P. Role of Annexin-II in GI cancers: interaction with gastrins/progastrins. **Cancer Lett**, v. 252, n. 1, p. 19-35, jul. 2007.

SIRTORI, C. R.; ARNOLDI, A.; JOHNSON, S. K. Phytoestrogens: end of a tale? **Ann Med**, v. 37, n. 6, p. 423-438, 2005.

SODERSTROM, C. E. et al. Detection with MR imaging of residual tumor in the breast soon after surgery. **AJR Am J Roentgenol**, v. 168, n. 2, p. 485-488, fev. 1997.

SOLOMON-ZEMLER, R.; SARFSTEIN, R.; WERNER, H. Nuclear insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) displays proliferative and regulatory activities in non-malignant cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1-14, set. 2017.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 283-296, abr. 2012.

SØRLIE T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 1, p. 2667-275. Dez. 2004.

SØRLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, v. 7, n. 127, p. 1-15, mai. 2006.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, set. 2001.

SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, jun. 2003.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 18, p. 10393-10398, ago. 2003.

SOUZA, W. F. de. et al. Sinalização celular em câncer. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 30-33, 2014.

SPECTOR, N. L.; BLACKWELL, K. L. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 34, p. 5838-5847, dez. 2009.

SUN, J. Q. et al. Spatholobus suberectus Column Extract Inhibits Estrogen Receptor Positive Breast Cancer via Suppressing ER MAPK PI3K/AKT Pathway. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 2934340, dez. 2016.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat Rev mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 85-96, fev. 2006.

TAVTIGIAN, S. V. et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nat Genet**, v. 12, n. 3, p. 333-337, mar. 1996.

TERRANOVA-BARBERIO, M. et al. HDAC inhibition potentiates immunotherapy in triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 69, p. 114156-114172, dez. 2017.

THEDIECK, K. et al. PRAS40 and PRR5- like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. **Plos One**, v. 2, n. 11, p. 1217, nov. 2007.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **MCF-10 Cells**. Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/cell-lines/m/cell-lines-detail-553.html> > Acesso em 02 jun. 2019.

THIRONE, A. C.; HUANG, C.; KLIP, A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. **Trends Endocrinol Metab**, v. 17, n. 2, p. 72-78, mar. 2006.

THORPE, L. M; YUZUGULLU, H; ZHAO, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting. **Nat Rev Cancer**, v. 15, n. 1, p. 7-24, jan. 2015.

VALAPALA, M; VISHWANATHA, J. K. Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. **J Biol Chem**, v. 286, n. 35, p. 30911-30925, set. 2011.

VANDER HAAR, E. et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 316-323, mar. 2007.

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

VASCONCELOS, R. G. et al. Ultrassonografia mamária- Aspectos contemporâneos. **Com. Ciências Saúde**, v. 22, n. 1, p. 129-140, 2011.

VECCHI, L. et al. Inhibition of the AnxA1/FPR1 autocrine axis reduces MDA-MB-231 breast cancer cell growth and aggressiveness in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 9, p. 1368-1382, set. 2018.

VIANA, L.; MARTINS, M.; GEBER, S. **Ginecologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

VODUC, K. D.; Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 10, p. 1684-1691, abr. 2010.

WANG, J.; DU, Q.; LI, C. Bioinformatics analysis of gene expression profiles to identify causal genes in luminal B2 breast cancer. **Oncol Lett**, v. 14, n. 6, p. 7880-7888, out. 2017.

WANG, T. et al. Anxa2 binds to STAT3 and promotes epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 30975-92, out. 2015.

WANG, Z. G. et al. RAD001 offers a therapeutic intervention through inhibition of mTOR as a potential strategy for esophageal cancer. **Oncol Rep**, v. 23, n. 4, p. 1167-1172, abr. 2010.

WEIGEL, B. et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 4, p. 339-349, abr. 2010.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 4, p. 245-262, set. 2010.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. **Sci Am**, v. 275, n.3, p. 62-70, set. 1996.

WEN, S. et al. Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies. **BMC Cancer**, v. 15, n. 520, p. 1-13, jul. 2015.

WITTEWER, C. Democratizing the Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*, v. 63, n. 4, p. 924-925, apr. 2017.

WOODWARD, W. et al. On mammary stem cells. **J Cell Sci**, v. 118, n. 16, p. 3585-3594, ago. 2005.

WOOSTER, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789-792, dez. 1995.

WULLSCHLEGER, S; LOEWITH, R.; HALL, M. N. Signaling in growth metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-484, fev. 2006.

XU, D. Z. et al. Activated mammalian target of rapamycin is a potential therapeutic target in gastric cancer. **BMC Cancer**, v. 10, n. 536, p. 1-10, out. 2010.

YANG, X. R. et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n. 3, p. 250-263, fev. 2011.

YERUSHALMI, R. et al. Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 1, p. 131-142, fev. 2012.

YOUNG, C. D.; ARTEAGA, C. L.; COOK, R. S. Dual inhibition of Type I and Type III PI3 kinases increases tumor cell apoptosis in HER2+ breast cancers. **Breast Cancer Res**, v. 17, n. 148, p. 1-11, dez. 2015.

YUAN, J. et al. Tyr23 phosphorylation of Anxa2 enhances STAT3 activation and promotes proliferation and invasion of breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 164, n. 2, p.327-340, jul. 2017.

ZHA, J; LACKNER, M. R. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 9, p. 2512-2517, mai. 2010.

ZHANG, X. et al. The association of annexin A2 and cancers. **Clin Transl Oncol**, v. 14, n. 9, p. 634-640, set. 2012.

ZHAO, J. J. et al. The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 51, p. 18443-18448, dez. 2005.

ZHAO, W. Q. et al. Secretion of Annexin II via Activation of Insulin Receptor and Insulin-like Growth Factor Receptor. **J Biol Chem**, v. 278, n. 6, p. 4205-4215, fev. 2003.

ZHAO, W. Q.; WAISMAN D. M.; GRIMALDI, M. Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. **J Neurochem**, v. 90, n. 3, p. 609-620, ago. 2004.

ZÓIA, M. et al. Inhibition of Triple-Negative Breast Cancer Cell Aggressiveness by Cathepsin D Blockage: Role of Annexin A1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1-17, mar. 2019.

ZONCU, R.; SABATANI, D. M.; EFEYAN, A. mTOR: from growth signal integration to câncer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n.1, p. 21-35, jan. 2011.