

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SABRINA CRISTINA GUEDES

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANEXINA A2 E CITOQUERATINA 10 EM
MODELOS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

PATOS DE MINAS – MG
SETEMBRO DE 2020

SABRINA CRISTINA GUEDES

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANEXINA A2 E CITOQUERATINA 10 EM
MODELOS CELULARES DE 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.

Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

**PATOS DE MINAS – MG
SETEMBRO DE 2020**

SABRINA CRISTINA GUEDES

Caracterização da expressão de Anexina A2 e Citoqueratina 10 em modelos celulares de 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.

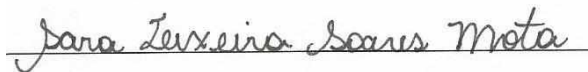
Banca examinadora:



Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU campus Patos de Minas
Presidente



Dra. Lara Vecchi – UFU
Membro



Msc. Sara Teixeira Soares Mota - UFU
Membro

Patos de Minas-MG, 28 de setembro de 2020

*Em memória de minha querida avó Maria das
Dores Guedes, grande fonte de inspiração,
com amor e saudades.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por me permitir chegar ao fim dessa jornada com força e coragem, porque para ele são todas as coisas!

A minha família: meus pais, Edivânna e Giovani, pelo apoio, conselhos e pelas orações constantes ao meu favor; aos meus irmãos, Camila e Fellipe pela compreensão e incentivo diário; aos meus avós, tios e primos, em especial ao meu tio Cosme, pela inspiração na caminhada acadêmica e à minha tia Eliene, pelo carinho e incentivo desde sempre, amo todos vocês!

Aos meus grandes amigos de longa data, Dayrelly e Danilo, por todo o carinho, incentivo e paciência constante, e que mesmo a distância, tiveram um papel ímpar na conclusão deste trabalho, gratidão por tudo, amo vocês!

Aos meus companheiros inseparáveis durante a graduação, Isabela e Christian, que se tornaram minha segunda família, a companhia de vocês tornou os dias difíceis suportáveis, muito obrigado por todos os momentos compartilhados durante esses anos, a amizade de vocês durante esse tempo foi uma benção para mim.

À minha orientadora, Dra. Thaise Araújo, pelo modelo impecável de profissional, pelo incentivo constante e pelos inúmeros momentos de compreensão e ensinamentos.

Aos meus colegas do laboratório de Genética e Biotecnologia do campus Patos de Minas pelos inúmeros aprendizados compartilhados, pelo apoio nos experimentos e pela caminhada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos da LinaBiotec, polo Patos de Minas, que me permitiram um imenso aprendizado, amadurecimento, e crescimento no âmbito pessoal e acadêmico. Gratidão a todos!

Aos meus inúmeros amigos da ABU, núcleo Patos de Minas, as orações e momentos que compartilhamos falando sobre Deus me deram conforto e incentivo.

Por fim, aos meus professores pelos conhecimentos adquiridos, colegas de graduação e a todos amigos que diretamente ou indiretamente cooperaram para essa jornada, á vocês minha gratidão eterna!

"Grandes são as obras do SENHOR, dignas de estudo para quem as ama."

(Salmos 111.2)

RESUMO

O câncer de mama (CM) é o tumor maligno mais comum e a principal causa de morte pela doença em mulheres em todo o mundo. Sua complexidade traduz-se em diferentes comportamentos clínicos de seus subtipos, sobretudo os triplo-negativos (CMTN). Os eventos moleculares destes tumores são desconhecidos, dificultando o desenvolvimento de terapias-alvo que melhorem a sobrevida das pacientes. No presente estudo, através de técnicas de citometria de fluxo e western-blotting, objetivou-se avaliar o perfil de expressão das proteínas Anexina A2 (AnxA2) e Citoqueratina 10 (Ck10) nas linhagens de células MCF10A (não-tumorigênica), MCF7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo triplo-negativo). Observou-se alta expressão de ambas proteínas nas linhagens MCF10A e MDA-MB231 por citometria de fluxo. Interessantemente, quando as proteínas celulares foram extraídas de modo fracionado (citoplasma/membrana separadas do núcleo), a marcação foi distinta entre as linhagens, frações proteicas e alvos. A AnxA2 se mostrou nitidamente menos expressa na linhagem MCF7 nas duas frações analisadas. A Ck10 não apresentou diferença na marcação para as proteínas nucleares. Verificou-se perda na expressão dessa proteína na fração citoplasma/membrana à linhagem luminal, que sugere um comportamento peculiar em células triplo-negativas. Não foi identificada marcação no sobrenadante de cultura. A ausência de marcadores específicos para o CMTN evidencia a importância de se compreender o perfil de expressão e o comportamento da AnxA2 e Ck10 nesses tumores. Nossos resultados permitirão o direcionamento de novas abordagens voltadas para esse subtipo tumoral e contribuirão para uma classificação mais detalhada do CMTN que carece de estratégias mais efetivas e amplas de tratamento.

Palavras-chave: Câncer de mama. Triplo-negativo. Biomarcadores. Anexina. Citoqueratina.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common malignant tumor and the leading cause of cancer death among women worldwide. The complexity of BC translates into different clinical behaviors of its subtypes, especially the triple negative one (TNBC). The molecular events of these tumors remain unknown, which hinders the development of target therapies that improve the patient's survival. In the present study, using flow cytometry and western-blotting techniques, the aim was to evaluate the expression profile of the proteins Annexin A2 (AnxA2) and Cytokeratin 10 (Ck10) in the MCF10A (non-tumorigenic), MCF7 (luminal phenotype) and MDA-B231 (triple-negative phenotype) cell lines. High expression of both proteins was observed in the MCF10A and MDA-MB231 strains by flow cytometry. Interestingly, when the cellular proteins were extracted in fractionated way (cytoplasm/membrane separated from the nucleus), the staining was distinct between the cell lines, the protein fractions, and the targets. AnxA2 was less expressed in MCF7 cell line in the two fractions analyzed. Considering Ck10, there was no difference in the staining for nuclear proteins. However, the expression of this protein was lower in the cytoplasm/membrane fraction for the luminal lineage, suggesting a peculiar behavior in triple-negative cells. No staining was identified in the culture supernatant. The absence of specific markers for TNBC highlights the importance of understanding the expression profile and behavior of AnxA2 and Ck10 in these tumors. Our results will drive new approaches for this tumor subtype and will contribute to a more detailed classification of TNBC, which lacks more effective treatment strategies.

Keywords: *Breast cancer. Triple negative. Biomarkers. Annexin. Cytokeratin.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnxA2: Anexina A2

ATP: Adenosina trifosfato

BRCA1: *Breast Cancer 1*

BRCA2: *Breast Cancer 2*

BSA: Albumina sérica bovina

CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*

Ck10: Citoqueratina 10

CM: Câncer de mama

CMTN: Câncer de mama triplo negativo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FCFb: Fator de crescimento de fibroblasto básico

HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HRP: Peroxidase de rabanete

IA: Inibidores da aromatase

IDC: Carcinoma Ductal Invasivo

LCIS: Carcinoma Lobular *in situ*

MCF10A: Linhagem tumoral fenótipo triplo negativo, não- tumorigênica

MCF7: Linhagem tumoral fenótipo luminal

MDA-MB23: Linhagem tumoral fenótipo triplo-negativo

PARP: Poli Adenosina difosfato Ribose

PD-1: Proteína da morte programada-1

PD-L1: Ligante da proteína da morte programada-1

PI-3K: Fosfoinositida 3-cinase

RE: Receptor de estrogênio

RFA: Ablação por radiofrequência

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RP: Receptor de progesterona

SERM: Moduladores seletivos do receptor de estrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Definindo os tumores malignos	10
1.2	O Câncer de mama.....	11
1.3	Os desafios acerca da caracterização molecular do Câncer de Mama.....	13
1.4	Anexina A2 e Citoqueratina 10 como prováveis marcadores para o CMTN	18
2	OBJETIVOS.....	23
	Objetivo Geral.....	23
	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Linhagens Celulares.....	23
3.2	Citometria de fluxo	24
3.3	Western-Blotting.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÃO.....	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definindo os tumores malignos

Câncer é, por definição, o nome de um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, quadro clínico conhecido como metástase. Diversas condições ambientais são associadas com o surgimento dessa patologia como os fatores físicos carcinogênicos, incluindo radiação ultravioleta e ionizante; químicos, como o amianto, as aflotoxinas e o arsênio; e biológicos, como infecções por vírus, bactérias ou parasitas. Hábitos não saudáveis, como o uso do tabaco, do álcool, de alimentos industrializados, sobrepeso (ou obesidade) e sedentarismo também são relacionados à ocorrência de neoplasias malignas. Considerando os aspectos inerentes aos indivíduos, o envelhecimento se destaca, uma vez que a incidência do câncer aumenta consideravelmente com a idade. De fato, com o decorrer do tempo, os mecanismos de reparo molecular se tornam ineficientes, comprometendo a integridade genômica (WHO, 2018).

Molecularmente, o desenvolvimento e crescimento das células neoplásicas decorre de mutações em genes supressores tumorais, os quais regulam o ciclo celular e apoptose, e em protooncogenes, que sinalizam para a progressão mitótica (WARD, 2002). Mutações nesses grupos de genes são críticas para a promoção do tumor e para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), em um microambiente complexo, altamente ativo e instável (WARD, 2002; CARVALHO, 2010).

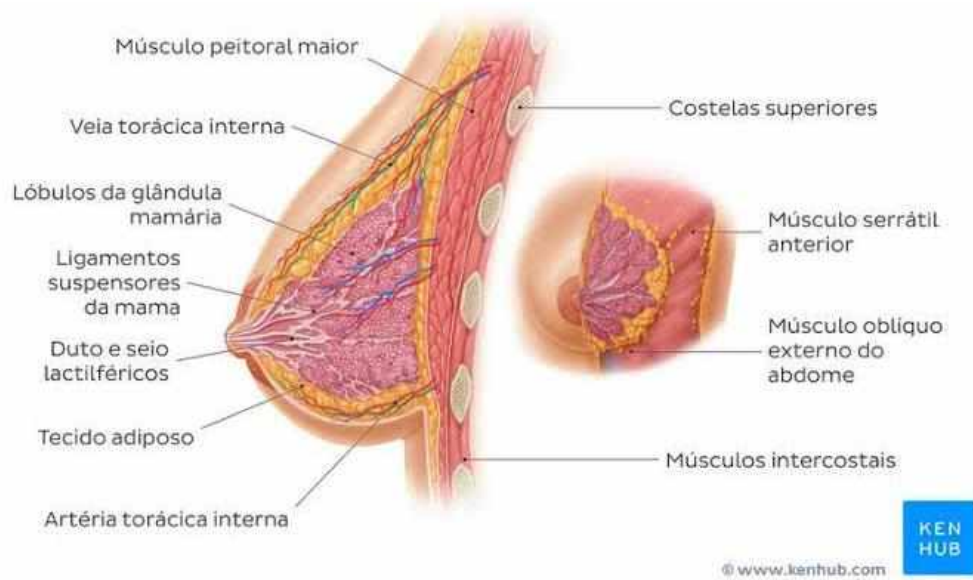
A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 29 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2040. Sua incidência varia nas diferentes regiões do mundo. Os números para cada 100.000 habitantes em países mais desenvolvidos como os da Europa Ocidental são 96,0; na América do Norte 91,6; os do Norte da Europa 89,4; e na Austrália e Nova Zelândia 85,8. Já em regiões menos desenvolvidas, os valores são menos expressivos como Centro-Sul da Ásia com 28,2 e Leste Asiático com 27,0. A melhora no acesso a programas de triagem e métodos terapêuticos eficazes têm contribuído, nos últimos anos, para o aumento nos índices epidemiológicos e para a melhora na sobrevida dos pacientes. Já em países africanos, o atraso no diagnóstico e tratamento é um determinante para a baixa sobrevida (menor que 50%) dos afetados (MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019; IARC, 2019). No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, são esperados 625 mil novos diagnósticos dessa doença. O câncer

de mama (CM) e próstata (66 mil cada) serão os mais incidentes após o câncer de pele não melanoma (177 mil). Destacam-se também as estimativas para os tumores de cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (ONCOGUIA, 2017; INCA, 2020).

1.2 O Câncer de mama

A mama feminina (Figura 1) compreende vários componentes anatômicos, sendo composta por tecido glandular, adiposo, conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas. É ancorada pelos ligamentos suspensores na fáscia peitoral maior. Sua irrigação sanguínea é derivada, principalmente, da artéria toracoacromial, da artéria torácica lateral e pelos ramos perfurantes mamários internos. Sua via de drenagem linfática ocorre por meio dos linfonodos axilares e através dos linfonodos mamários e intercostais posteriores. A mama é constituída por 15 a 20 lobos compostos por um conjunto de ácinos responsáveis pela produção do leite durante a lactação, que, em conjunto, se ligam à papila por meio de um ducto lactífero.

Figura 1-Anatomia da mama feminina.



Fonte: Kenhub GmbH 2020

Os ductos mamários são pequenos vasos que conectam os alvéolos de um lóbulo até o mamilo, formados por células epiteliais que compõem o revestimento interno e células mioepiteliais presentes no revestimento externo dessa estrutura, em contato com a membrana

basal. A principal função dos ductos é drenar a secreção dos lóbulos através da contração das células mioepiteliais (SBMASTOLOGIA, 2017; ONCOGUIA, 2017).

O desenvolvimento da mama é influenciado por hormônios esteroides, como o estrogênio e a progesterona, que estimulam a proliferação celular e são, portanto, também relacionados a condições patológicas como o câncer (AMB, 2017). O CM é considerado um problema de saúde pública. No Brasil, após o câncer de pele não melanoma, é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (81,06 /100 mil), Sul (71,16 /100 mil), Centro-Oeste (45,24 /100 mil) Nordeste (44,29 /100 mil) e Norte (21,34/100 mil) (INCA, 2020). Estima-se que, por ano, 8,8 milhões de mortes em todo o mundo são relacionadas ao CM (WHO, 2017).

O diagnóstico pode ser realizado por mamografia, ultrassonografia e/ou ressonância magnética. Quando detectadas alterações suspeitas, as pacientes são conduzidas à biópsia ou punção tecidual. A mamografia utiliza raios-x para identificar possíveis alterações patológicas. No ultrassom, ondas sonoras de alta frequência rastreiam a glândula e permitem sua visualização. Na ressonância magnética são criadas imagens transversais dos órgãos internos, determinando, com maior precisão, o tamanho do tumor e a existência, ou não, de outros focos da doença. Por fim, na biópsia, há a remoção de uma pequena quantidade de tecido para avaliação anatomopatológica e confirmação da presença da lesão (COLDITZ; BOHLKE, BERKEY, 2014; ONCOGUIA, 2017).

Histologicamente, o CM pode ser definido como não invasivo e invasivo, sendo que as estruturas mais acarretadas são os ductos seguidos pelos lóbulos. O Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS) é aquele em que as células cancerígenas ainda não se espalharam através das paredes dos ductos para o tecido mamário vizinho e, portanto, sem risco inicial de metastatização. Similarmente, no carcinoma Lobular *in situ* (LCIS) as células transformadas crescem no interior dos lóbulos. Já o Carcinoma Ductal Invasivo (IDC), o mais comum, as células tumorais rompem a parede do ducto atingindo tecidos subjacentes com capacidade de se instalarem em sítios distantes (TAVASSOLI; EUSEBI, 2009; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). A análise patológica também permite o estadiamento da lesão, o que define o prognóstico e a estratégia para o tratamento das pacientes.

Além disso, a predição do comportamento das lesões e de estratégias terapêuticas mais eficazes é possível devido às características moleculares apresentados por cada subtipo tumoral. Apesar de limitada diante da complexidade do CM, essa categorização é bastante utilizada na prática clínica. Os marcadores avaliados são: o receptor de estrogênio (RE), o receptor de progesterona (RP), e o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

(HER2), geralmente amplificado em alguns grupos de tumores mamários (HON et al., 2016). A detecção é realizada por imunoistoquímica e permite a classificação do CM em quatro subtipos principais: Luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2-), Luminal B (RE+/-, RP+, HER2+/-), HER2-enriquecido (RE-, RP-, HER2+) e Triplo-negativo (RE-, RP-, HER2-) (GOLDHIRSCH, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O luminal A é caracterizado como positivo para RE, RP e negativo para HER2, além de apresentar baixos níveis de Ki-67. Esta é uma proteína nuclear responsável pela manutenção e/ou regulação do ciclo celular. O câncer Luminal A é de baixo grau, tende a crescer lentamente, e, por conseguinte, possui o melhor prognóstico. Já o subtipo Luminal B é positivo para RE e/ou RP com altos níveis de Ki-67. Quanto ao HER2, podem ou não superexpressar essa proteína. São tumores de pior prognóstico quando comparados ao Luminal A (TYANOVA et al., 2016; HON et al., 2016).

Lesões que superexpressam HER2, nomeadas HER2-enriquecidas são negativas para os receptores hormonais. Esses cânceres tendem a crescer mais rapidamente que os luminais e apresentam pior prognóstico. Contudo, respondem ao tratamento com anticorpos anti-HER2 (TYANOVA et al., 2016; HON et al., 2016).

O subtipo triplo-negativo (TN) corresponde a 15% do total de casos da doença, sendo que de 5% a 10% destes são ligados à herança de mutações genéticas. Os tumores TNs são heterogêneos, de alto grau e bastante agressivos, com altas taxas de recorrência e baixa sobrevida global (AMENDOLA; VIEIRA et al., 2005; COELHO et al., 2018). O CM triplo-negativo (CMTN) é mais comum em mulheres jovens e que apresentam predisposição hereditária com mutações nos genes *BRCA1* (*Breast Cancer1*) e *BRCA2* (*Breast Cancer 2*). Como não expressam RE, RP nem HER2 não respondem a terapias específicas já rotineiramente utilizadas como a endócrina e a que utiliza o anticorpo anti-HER2 (MAROTTI et al., 2017).

1.3 Os desafios no estadiamento e tratamento do Câncer de Mama

O estadiamento clínico estima a extensão da doença baseado nos resultados do exame físico, exames de imagem e biópsia do tumor. O mais comum é o sistema TNM (*Tumor Node Metastasis*). Neste, o “T” refere-se ao tumor primário, seu tamanho, o quanto se desenvolveu no órgão de origem e a invasão de tecidos adjacentes. O “N” descreve o comprometimento dos linfonodos e o “M” define a presença de metástase em outros órgãos (UICC, 2004). Para o CM, o sistema adotado encontra-se descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Estadiamento dos tumores mamários conforme o sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*). Neste são analisados o tamanho do tumor primário (T), comprometimento linfonodal (N) e presença de metástase (M).

Aspecto avaliado	Descrição
Tamanho Tumoral (T)	TX Tumor primário não pode ser avaliado
	T0 Não há evidência de tumor primário
	T1 Tumor < 2 cm em sua maior dimensão
	T2 Tumor > 2 cm e <5 cm em sua maior dimensão
	T3 Tumor > 5 cm em sua maior dimensão
Comprometimento Linfonodal (N)	T4 Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele
	NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
	N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais
	N1 Metástase em linfonodos axilares, homolaterais e móveis
	N2 Metástase em linfonodos axilares, homolaterais e fixos
Metástase (M)	N3 Metástase em linfonodos infra claviculares, homolaterais, com ou sem envolvimento de linfonodos axilares.
	MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
	M0 Ausência de metástase
	M1 Presença de metástase

Fonte: Adaptado União Internacional Contra o Câncer (UICC), 6ª edição-2004.

Já na gradação histológica do CM, utiliza-se o grau de Nottingham, o qual indica o nível de diferenciação da lesão por meio de uma avaliação semiquantitativa das características morfológicas do tecido, incluindo semelhança com células mamárias normais (grau nuclear), índice mitótico e extensão do tumor. Por estar altamente relacionado à agressividade da doença, pode ser utilizado para discriminar as pacientes em três grupos: (i) Grau 1, em que as células estão crescendo mais lentamente e se assemelham ao tecido mamário normal; (ii) Grau 2, com células apresentando características histológicas moderadamente diferenciadas; e (iii) Grau 3 em que há a perda das características originais e as células crescem de forma agressiva

e invasiva (AQUINO, 2017). Esta capacidade se associa diretamente ao processo de metastatização, com a circulação das células cancerosas através dos sistemas sanguíneo e/ou linfático (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Todos esses aspectos analisados microscopicamente são considerados na decisão terapêutica. Portanto, o tratamento para o CM é estabelecido conforme sua caracterização (GREENLEE et al., 2017). As principais estratégias incluem: a quimioterapia, a radioterapia, a hormonioterapia e a imunoterapia.

A quimioterapia, iniciada pelo químico alemão Paul Ehrlich, utiliza compostos químicos (quimioterápicos) para matar e conter, de maneira sistêmica, a multiplicação de células neoplásicas ao interferir em diferentes fases do ciclo celular. Os principais agentes quimioterápicos incluem alquilantes, nos quais um átomo de hidrogênio é substituído por um radical alquila impedindo a replicação do DNA; os antimetabólitos, responsáveis por bloquear a biossíntese de ácidos nucleicos e os inibidores mitóticos, os quais paralisam a mitose na metáfase, impedindo a migração dos cromossomos e interrompendo a divisão celular (INCA, 2017).

O desenho terapêutico pode prever a administração de uma ou mais drogas (poliquimioterapia), sendo que este formato tem se mostrado mais eficaz em um cenário de resistência ao tratamento. Contudo, também atinge células normais, o que define sua toxicidade. Nesse contexto, podem surgir efeitos indesejáveis, como: alopecia, náuseas, vômitos e diarreia (DE VITA et al., 2008). De acordo com a sua finalidade, a quimioterapia pode ser classificada em: curativa, quando o objetivo é o controle completo do tumor; adjuvante quando é utilizada após a cirurgia, atingindo possíveis células tumorais circulantes; neoadjuvante, quando antecede à intervenção cirúrgica para redução parcial do tumor; e paliativa visando apenas à melhora da qualidade de vida da paciente. Além disso, também pode ser administrada juntamente com cirurgia e radioterapia (GREENLEE et al., 2017).

A radioterapia é um método que emprega feixes de radiações ionizantes para destruir as células tumorais. A dose e local de incidência são previamente calculados considerando o tempo de exposição, o volume específico de tecido tumoral e o não comprometimento de órgãos saudáveis. Pode ser realizada de maneira isolada ou associada aos outros métodos terapêuticos. Quanto aos seus efeitos colaterais destacam-se: anovulação, dermatites e mielodepressão (AMERICA CANCER SOCIETY, 2017).

A hormonioterapia é uma técnica de manipulação do sistema endócrino bastante utilizada para o tratamento de neoplasias malignas positivas para receptor de estrógeno (RE). É uma forma de terapia sistêmica curativa ou paliativa, aplicada de forma isolada ou em combinação com outros tratamentos, com ações aditivas ou supressivas. São utilizados os

moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM), impedindo o estímulo tumoral mediado por esses hormônios. São exemplos de SERM's o Tamoxifeno, o Fulvestranto e o Toremifeno. É baixa a incidência de efeitos colaterais graves, sendo os mais comumente relatados: ondas de calor, sudorese noturna, náuseas e fadiga (ONCOGUIA, 2017; INCA, 2017). Também se destacam os inibidores da aromatase (IA), uma enzima do citocromo p450 responsável por converter andrógenos em estrógenos, sendo usados em mulheres na pré-menopausa. Antes da menopausa, a maior parte dos estrógenos femininos são sintetizados nos ovários. Contudo, após o início da insuficiência ovariana, a principal fonte de esteróides sexuais passa a ser a córtex supra-renal, que os produz na forma de andrógenos. A aromatase, nos tecidos periféricos, converte a androstenediona em testosterona e em estradiol, garantindo a manutenção de um ambiente estrogênico na mulher menopausada (SAAD et al., 2002). Os IAS usados nas mulheres menopausadas são substâncias que bloqueiam a aromatização de andrógenos, causando efeitos colaterais mínimos, semelhantes aos sintomas da menopausa e os causados pelos SERM's. Em casos mais graves há relatos de desgaste ósseo, levando à osteoporose e aumento do colesterol (DAMIANI; DAMIANI, 2007).

A imunoterapia, por sua vez, tem se destacado e se mostrado promissora no tratamento oncológico. Baseia-se na modulação do sistema imunológico e/ou na interação antígeno-anticorpo, em uma interface entre competência imunológica e evolução favorável do paciente. Os mediadores da resposta imunológica podem ser classificados como fatores auxiliares, supressores, reguladores do crescimento e citotóxicos. Na imunoterapia ativa são utilizadas substâncias estimulantes ou vacinas com células tumorais (autóloga ou heteróloga). Na passiva, são administrados anticorpos a antígenos-chave auxiliando no combate à doença (AMERICA CANCER SOCIETY, 2017). Desta forma, a caracterização molecular do CM é indispensável para o direcionamento da conduta clínica.

Para o CM, novas terapias encontram-se em ascensão. Essas opções não cirúrgicas têm vários benefícios, incluindo diminuição do risco de complicações e redução no tempo de recuperação, diminuindo a morbidade e a mortalidade das pacientes (BARRAL et al., 2016). A hipertermia é baseada na elevação da temperatura local, sendo normalmente administrada em conjunto com outras estratégias de intervenção. Os tecidos tumorais são aquecidos por agentes externos a temperaturas de, no mínimo, 40/41°C, durante um período rigorosamente estabelecido. A elevação da temperatura causa predominantemente desnaturação intracelular de proteínas, desestabilizando membranas celulares, citoesqueleto, enzimas, e alterando a transdução de sinais e a síntese de macromoléculas (HILDEBRANDT et al., 2002; BARONZIO et al., 2014). A ablação por radiofrequência (RFA) é um método alternativo não

invasivo, que utiliza um eletrodo de radiofrequência para aquecer e coagular um tecido alvo. Para essa técnica, a orientação de imagem, através de tomografia computadorizada ou ultrassonografia, é fundamental para garantir a inserção correta do eletrodo e monitoramento da resposta do tumor durante o procedimento (NGUYEN et al., 2014). Já a fototerapia é uma das mais promissoras com maior penetração tecidual, toxicidade celular moderada e irradiação de luz espacialmente controlada através do uso de agentes fotossensíveis direcionados (CLARKE et al., 2015). Adota-se a ablação térmica das células tumorais por hipertermia, ou ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por fotossensibilizadores. São desencadeadas alterações no metabolismo celular e, posteriormente, a morte celular programada (SARKAR et al., 2013). A fototerapia com UV-B já é amplamente utilizada para tratar vários distúrbios da pele com efeitos colaterais mínimos. Estudos anteriores mostraram que a fototerapia reduz o risco de recidiva, e, portanto, melhora o prognóstico das mulheres em tratamento (CLARKE et al., 2015).

A imunoterapia e os inibidores da enzima Poli Adenosina difosfato Ribose (PARP) têm se destacado como uma proposta promissora para o tratamento do CMTN. A PARP encontra-se envolvida com os mecanismos de reparo do DNA por excisão de base e sinalizando para outras proteínas celulares críticas, como a p53. Estudos clínicos de inibidores de PARP demonstraram seus papéis no aumento dos efeitos citotóxicos das radiações ionizantes e das terapias quimioterápicas, já que o reparo se encontra comprometido (CALABRESE et al., 2004) e as células sinalizam para a apoptose (LAJUS, 2010). Células mutadas para os supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* se mostram até 1.000 vezes mais sensíveis ao inibidor de PARP. Pois esses agentes são capazes de provocar quebras dupla fita no DNA, que serão reparadas pela via de recombinação homóloga, via na qual as proteínas *BRCA1* e *BRCA2* participam (MOYNAHAN et al., 1999 *apud* LAJUS, 2010). Portanto, a inibição da PARP-1 causa uma persistência da lesão no genoma, desta forma, as células tumorais que já apresentam deficiência na via de recombinação homóloga dependente de *BRCA1*, não conseguem reparar as quebras do genoma; sendo assim, apenas as células saudáveis aptas a recombinação homóloga, restauram as lesões continuando viáveis (LAJUS, 2010).

Portanto, seu uso foi aprovado para os casos de CMTN mutados para os genes *BRCA*, com resultados promissores (BRYANT et al., 2005; LAJUS, 2010).

Uma das vias de resposta imune antitumoral mais importantes no câncer é a constituída pela proteína da morte programada-1 (PD-1), sendo este um receptor expresso na superfície dos linfócitos T e de várias outras células imunológicas. Um de seus principais ligantes, o PD-L1

(ligante da proteína da morte programada-1), atua como uma proteína imunoreguladora, ao reprimir a ação de linfócitos T citotóxicos (BAPTISTA, 2016). A expressão de PD-L1 é identificada em alguns pacientes com CM, com superexpressão comumente observada em CMTN. No tratamento destes, agentes anti-PD-1 / PD-L1 têm se mostrado promissores (PLANES-LAINE et al., 2019), uma vez que permite o estímulo de linfócitos T no combate às células transformadas. Contudo, ainda é restrito o grupo de mulheres com CMTN que responde às novas terapias, permanecendo imutável as características de agressividade, prognóstico ruim e baixa taxa de sobrevida global associados a esse subtipo. Com isso, permanece expectável a identificação de alvos e abordagens terapêuticas com a caracterização de marcadores moleculares associados ao subtipo triplo negativo, possibilitando assim o direcionamento de terapias mais eficazes, e consequentemente a melhora da qualidade de vida dos pacientes (LIU et al., 2012).

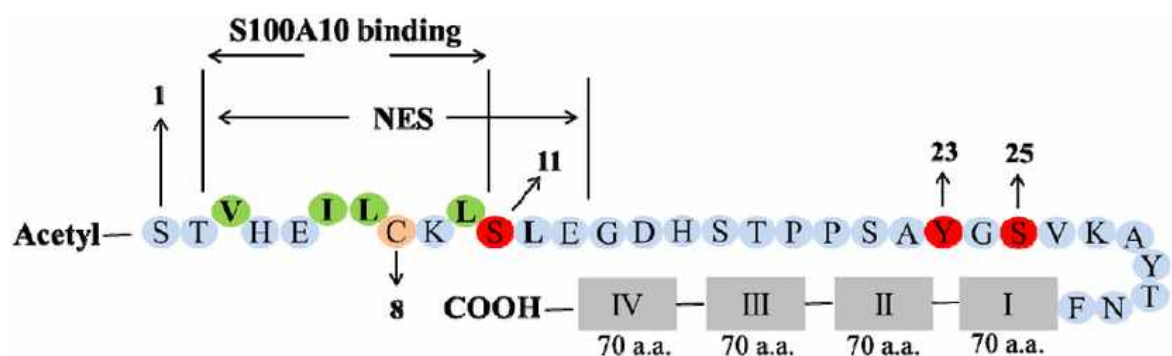
1.4 Anexina A2 e Citoqueratina 10 como prováveis marcadores para o CMTN

A família das Anexinas (Anx) é formada por proteínas pleiotrópicas, com ampla distribuição no citoplasma, membrana celular e em menores proporções no núcleo das células eucarióticas. Estão envolvidas em múltiplos processos celulares, como regulação do crescimento celular, transdução de sinal, coagulação, endocitose e exocitose (RESCHER; GERKE, 2004; BHARADWAJ et al., 2013). São caracterizadas por apresentarem estrutura com ligação periférica a fosfolipídios de membrana. São compostas por uma extremidade C-terminal que contém uma sequência de 70 a 80 aminoácidos encarregados por se ligarem aos fosfolipídios, íons cálcio (Ca^{2+}) e adenosina trifosfato (ATP); e uma extremidade N-terminal associada a modificações pós traducionais como fosforilação, glicosilação, clivagem proteolítica seletiva e a interações proteína-proteína (KIM et al., 2001; WANG et al., 2014).

A AnxA2 (Figura 2) é uma proteína de 36 kDa, codificada pelo gene *ANXA2*, expressa em algumas células tumorais, células endoteliais, macrófagos e células mononucleares. Pode existir como monômero ou na forma de um complexo heterotetramérico conjugado com S100A10 (p11), denominado AII_t. Que reorganiza o citoesqueleto de actina e possui implicações no processo de exocitose e endocitose. As funções desempenhadas pela AnxA2 diferem em cada uma de suas apresentações. Quando associada a S100S10 há uma redução na dependência de cálcio intracelular, de milimolar para micromolar, para que a AnxA2 se ligue a fosfolipídios membranares. Além disso, a AnxA2 protege o S100A10 da degradação

mediada pela ubiquitina. A estabilidade de S100A10 está intimamente associada à geração de plasmina, uma serina protease com ação antitrombótica que foi descrita por promover a invasão e formação de metástases das células transformadas. Extracelularmente, a AnxA2 funciona como um receptor para a subunidade S100A10, o qual desempenha um papel de extrema relevância na permeabilidade celular ao regular a geração da enzima proteolítica plasmina e na transdução de sinal ancorando S100A10 no exterior da superfície da membrana plasmática (BHARADWAJ et al., 2013). Além disso, comporta-se com uma proteína ligante para proteases (catepsina B, plasminogênio e ativador do plasminogênio tecidual) e para proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo 1), as quais, no câncer, também estão envolvidas em processos relacionados à progressão tumoral (MAI et al., 2000; WANG et al., 2014). Sugere-se que a expressão anormal de AnxA2 e sua localização subcelular está fortemente correlacionada a uma gama de doenças autoimunes, neurodegenerativas e inflamatórias (MUSSUNOOR; MURRAY, 2008; XU et al., 2015).

Figura 2- Figura representativa dos domínios estruturais da proteína Anexina A2. Esta é composta por dois domínios: (i) o amino-terminal em que ocorrem modificações pós-traducionais como acetilação (Ser-1) e fosforilação (Ser-11, Tyr-23, Ser-25) e (ii) o carboxi-terminal com quatro domínios predominantemente alfa-helicoidais, cada um contendo 70 aminoácidos. O S100A10 se liga a uma hélice α anfípática, com os resíduos hidrofóbicos Val-3, Ile-6, Leu-7 e Leu-10. NES: sinal de exportação nuclear.



Fonte: Adaptado de BHARADWAJ et al., 2013.

A expressão da AnxA2 é regulada em níveis transcricionais pelo fator de crescimento de fibroblasto básico (FCFb), pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e pela insulina. Ademais, isoformas de AnxA2 decorrentes de *splicing* alternativo possuem alterações em suas regiões amino-terminais, comprometendo sua interação com S100A10 (BHARADWAJ et al., 2013). Quanto às complexas modificações pós-traducionais, a fosforilação é a mais amplamente investigada, uma vez que afeta sua localização e interação com outras moléculas e, portanto, é crucial para as funções desempenhadas. Os principais locais de fosforilação encontram-se nos resíduos de Serina (posições 11 e 25) e no de Tirosina posição

23. A fosforilação em Tyr23, bem como a desfosforilação em Ser11, estão associadas à dissociação do complexo S100A10 e a rearranjos dos filamentos de actina, alterando a motilidade celular (GRINDHEIM et al., 2017). A fosforilação da AnxA2 no Tyr23 expõe a proteína na superfície celular, estimulando a proliferação e migração celulares dependente de EGFR em células de CMTN (CHAUDHARY et al., 2014). Essa fosforilação também aumenta a fosforilação do fator de transcrição STAT3, envolvido na agressividade tumoral, promovendo a progressão de células tumorais mamárias (GRINDHEIM et al., 2017).

Já a acetilação em Ser1 no domínio N-terminal da molécula, também regula a ligação da AnxA2 ao complexo S100A10 (BHARADWAJ et al., 2013).

A expressão da AnxA2 no câncer é controversa e ainda pouco compreendida. No CM foi observada sua superexpressão em tumores invasivos, no carcinoma ductal *in situ*, e em células malignas mamárias HER-2 negativas (CHRISTENSEN et al., 2018), evidenciando um pior prognóstico também no CMTN (SHARMA et al., 2006a,2006b; SYED et al., 2007). A expressão elevada dessa proteína também é correlacionada com o aumento da produção de sinais pró-inflamatórios e com a atividade neoangiogênica (SHARMA et al., 2010). Zhang e colaboradores (2010), realizaram o silenciamento da expressão de AnxA2 em células de CM, o que conduziu à parada do ciclo celular e induziu a apoptose. Uma análise proteômica quantitativa em células MCF-7 demonstrou que a AnxA2 está potencialmente envolvida com a resistência à quimioterápicos (doxorrubicina e paclitaxel) no CM (BHARADWAJ et al., 2013 *apud* CHUTHAPISITH et al., 2007). A AnxA2 também participa de diferentes vias de transdução de sinal. Sua interação com o gene supressor de tumor homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) foi descrita recentemente por Castaldo et al., (2019) e associada ao controle da fosforilação de Akt, a qual desempenha um importante papel na regulação do ciclo celular.

Diferentes proteínas já foram descritas interagindo com a AnxA2 como o Potencializador de migração e invasão¹, superexpresso em tecidos tumorais e responsável por regular a apoptose, processos redox e migração celular (KUSHWAHA et al., 2019). No CM, é correlacionado com o estágio da doença, sobretudo com a ocorrência de metástases distantes como no pulmão e fígado (EVANS et al., 2006; KUSHWAHA et al., 2019). MIEN1 conduz a um aumento na fosforilação de AnxA2 no resíduo Tyr23, o que estimula sua translocação para a superfície extracelular (ZHAI et al., 2011; KPETEMEY et al., 2015). A AnxA2 também interage com a Citoqueratina 17 (Ck17) via EGFR, modulando a proliferação, crescimento celular, e inflamação epitelial. Uma maior expressão da proteína Ck17 já foi identificada em carcinomas mamários, cervicais, escamosos orais e gástricos (YANG et al., 2019). Chung et al., (2012), demonstraram que a AnxA2 se liga à Ck17 alterando sua

estabilidade. Além disso, esta também regula na fosforilação de AnxA2 em Tyr23. Portanto, a interação entre AnxA2 e filamentos intermediários afeta a dinâmica do funcionamento de células tumorais, o que representa um possível mecanismo promotor da oncogênese. Em um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, a Ck10 e aAnxA2 colocalizam em linhagens de CMTN (ALVES, 2018).

As citoqueratinas (Cks) são proteínas constituintes do citoesqueleto das células epiteliais e compõem o maior grupo dos filamentos intermediários, correspondendo, em humanos, por pelo menos três quartos de todas as proteínas filamentosas. Encontram-se descritos aproximadamente 20 tipos diferentes, conectando as células por meio de junções do tipo desmossomos, oferecendo força mecânica e estabilidade aos tecidos (LANE et al., 2004). São separadas em citoqueratinas do tipo I (ou ácidas, Ck9 a Ck23) e as do tipo II (ou básicas, Ck1 a Ck8) (KARANTZA, 2010). Estruturalmente, apresentam um domínio α -helicoidal central de aproximadamente 310 aminoácidos. Este é composto por subdomínios intercalados por segmentos curtos não helicoidais, chamados de segmentos ligantes L1, L12 e L2. Já os domínios não-helicoidais da cabeça e cauda se encontram nas extremidades da molécula e consistem nos subdomínios V1 e H1 e H2 e V2 respectivamente, como representado na Figura 3 (HERRMANN et al., 2007).

Figura 3- Representação da estrutura principal das citoqueratinas (Cks) secundárias Ck1/Ck10/Ck9/Ck2e, Ck6/Ck16/Ck17, Ck4/Ck13, Ck3/Ck12. Os domínios de haste helicoidal α abrangem 1A a 2B formando dímeros que podem se agrupar em filamentos de 10 nm de largura. Também estão representados os subdomínios intercalados por segmentos curtos não helicoidais, chamados de segmentos ligantes L1, L12 e L2, e por domínios não-helicoidais da cabeça e cauda que consistem nos subdomínios V1 e H1 e H2 e V2 respectivamente.



Fonte: Adaptado de LANE et al., 2004

Cks desempenham várias funções já descritas como: reguladoras moleculares, polarização apico-basal, motilidade, controle do tamanho celular, síntese de proteínas, transporte entre membranas e sinalização (ALMEIDA JUNIOR, 2004). Sua distribuição varia conforme cada epitélio, sendo possível, assim, que sejam utilizadas como importantes marcadores de diferenciação epitelial (KARANTZA, 2010). A Ck10 é uma proteína suprabasal de aproximadamente 56,5Kda que, em humanos, é codificada pelo gene *KRT10*. Possui um peso molecular relativamente alto, sendo expressa no epitélio escamoso

estratificado. No citoplasma, a Ck10 se associa a Ck1 formando os filamentos intermediários de queratina, que se agrupam em redes fornecendo força e resiliência à pele, além de proteção a danos por atrito e outras tensões físicas. Mutações pontuais no gene *KRT10* resultam em uma rede de filamentos prejudicada, comprometendo a sua capacidade de resistir de forma eficaz ao estresse e a fortes compressões, perdendo sua capacidade protetora. Por conseguinte, os queratinócitos suprabasais se tornam frágeis, resultando em sua citólise (MÜLLER et al., 2006; PALKÓ, 2018).

Alterações na expressão da Ck10 estão associadas a manifestação de diversas doenças, principalmente transtornos epidérmicos, como a Ictiose e Hiperqueratose epidermolítica (MÜLLER et al., 2006; CHOATE et al., 2010). Com relação ao câncer, a expressão de Cks tem valor diagnóstico e até prognóstico, pois as células tumorais tendem a reter sua expressão em células epiteliais de origem, sendo, portanto, moléculas consideradas marcadores úteis para determinar o foco primário dos tumores, a fim de auxiliar nas estratégias de tratamento. Além disso, papéis moduladores atribuídos a essas proteínas nas vias de sinalização e regulação do crescimento e da morte celulares são indicativos importantes da utilização das Cks como marcadores oncológicos (YANG et al., 2019; SHETTY et al., 2012; SOUZA, et al., 2019).

Algumas Cks modulam dinamicamente sua expressão de acordo com o processo carcinogênico. No câncer gástrico, por exemplo, há a superexpressão de Ck7 e perda de Ck20. Já no carcinoma espinocelular ocorre o aumento da expressão de Ck 1, 5, 6, 8, 19 (KIM et al., 2004; MAKINO et al., 2009). No carcinoma epidermóide de boca e orofaringe Safadi et al., (2019), identificaram menores níveis de Ck10,14 e 16 e uma maior expressão de Ck19 foi associada a um quadro de metástase a distância. Sabe-se que as Cks, em sua totalidade, funcionam de maneira altamente dependente do contexto no qual estão inseridas. No CM essas proteínas possuem relevante valor clínico. Cheung et al., (2016), descreveram que a expressão de Ck14 é relacionada a metástases distantes. Comportamento semelhante foi observado para a Ck19, cuja maior expressão foi correlacionada com menor sobrevida do paciente (SHARMA, 2019). Células de CM positivas para Ck5 apresentam fenótipo basal mais agressivo, além de se mostrarem resistentes à terapia (KABOS et al., 2011; JOENSSU et al., 2013; SATO et al, 2014).

Em 2009, um estudo de Kohler et al., sugeriu que o CM pode expressar Cks capilares. A Ck81, por exemplo, foi associada à migração e invasão de células tumorais mamárias (NANASHIMA et al., 2017). Quanto a Ck10, não há relatos de sua expressão no CM. Um estudo prévio com camundongos transgênicos, em que a expressão de Ck10 humana foi

direcionada para a camada basal da epiderme, demonstrou redução da proliferação celular, indicando o papel dessa Ck na inibição da formação de tumores *in vivo* (SANTOS, 2002; PALKÓ, 2018). No carcinoma hepatocelular, a expressão de Ck10 foi detectada em uma linhagem de células MHCC97-H de elevado potencial metastático. Contudo não identificada na linhagem menos agressiva MHCC97-G (YANG et al., 2008). Foi previamente demonstrado que Ck10 interage com Akt e PKC ζ impedindo sua translocação e controlando a proliferação celular ao modular a via de transdução de sinal da fosfoinositida 3-cinase (PI-3K) (PARAMIO et al., 1999). Acredita-se na possibilidade de que alterações conformacionais na Ck10 possam estar associadas à perda de sua função (SANTOS, 2002), e, embora ainda não descrito na literatura, esta proteína pode ser um biomarcador promissor para o CM.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a expressão da AnxA2 e Ck10 em linhagens celulares mamárias.

Objetivos Específicos

- Cultivar as linhagens mamárias MCF-10A (não-tumorigênica), MCF-7 (tumoral com fenótipo luminal) e MDA-MB231 (tumoral com fenótipo triplo-negativo);
- Avaliar o perfil de expressão total das proteínas AnxA2 e Ck10;
- Avaliar o perfil de expressão das proteínas AnxA2 e Ck10 em diferentes compartimentos celulares (núcleo, membrana, citoplasma e sobrenadante).
- Definir o perfil de expressão desses dois marcadores (AnxA2 e Ck10) no CM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens Celulares

Para o cultivo celular foram utilizadas três linhagens celulares da mama:

- MCF-10A (não tumorigênica): cultivada em meio DMEM-F12 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 10 ng/ml de fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco®), 0,25µg/ml de hidrocortisona (Sigma®), 10 µg/ml de insulina (Gibco®) e 50 µg/ml de gentamicina (Cultilab®).
- MCF-7 (fenótipo luminal): cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/ml de gentamicina.
- MDA-MB231 (fenótipo basal): cultivada em meio L15 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/ml de gentamicina.

Todas foram adquiridas do ATCC e mantidas a 37°C de 2 a 3 semanas, trocando-se o meio a cada 48 horas, até a confluência de 80% das células quando estas foram utilizadas nos experimentos para análise de expressão. As linhagens MCF-10A e MCF-7 também foram cultivadas em atmosfera de 5% de CO₂.

3.2 Citometria de fluxo

Para avaliar a expressão total das proteínas AnxA2 e Ck10 nas linhagens mamárias, a quantidade de células usadas para cada linhagem celular foi: 3,5x10⁶ para MCF-7; 3,88x10⁶ para MDA-MB231 e 4x10⁶ para MCF-10A. As células foram desagregadas, ressolubilizadas em tampão fosfato-salino (PBS), fixadas e permeabilizadas com o kit Cyto Fix / Cyto Perm (BD GolgiStop™). Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo anti-AnxA2 (1:50; 0034400, Invitrogen) e anti-Ck10 (1:50, MAB3003, Abnova). O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com ficoeritrina (PE) (1:100; 656111, Invitrogen). As células também foram incubadas com o anticorpo secundário como controle para marcações inespecíficas. Foi utilizado o citômetro de fluxo Accuri C6, (BD Pharmingen™), cujo software foi empregado para as análises.

3.3 Western-Blotting

Para a obtenção dos extratos proteicos do núcleo e citoplasma/membrana das três linhagens celulares MCF-10A; MCF-7 e MDA-MB231 foram realizados os procedimentos descritos pelo fabricante do kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents

(Thermo Scientific). Às proteínas foi adicionado inibidor de protease (Cell Signaling Technology) e as frações proteicas foram estocadas a -80°C.

Para a quantificação das proteínas utilizou-se o kit Pierce® BCA Protein Assay de acordo com as instruções do fornecedor. A curva de calibração foi plotada de acordo com os dados referente a soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA), diluídas em água na faixa de 0,01 a 0,1g/L. Incubou-se as células tratadas com o kit Pierce® BCA durante 30 minutos a 37°C e, após esse período, a quantificação proteica foi efetuada usando um espectrofotômetro NanoDrop2000c (Thermo-Scientific®) registrando-se os valores no comprimento de onda de 562 nm.

As proteínas das duas frações (membrana/citoplasma e núcleo) extraídas para cada uma das três linhagens foram resolvidas por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10%. A transferência foi conduzida a 100V por 16 horas para uma membrana de nitrocelulose (Hi-Bond C; Amersham GE). Finalizada a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado solubilizado em Tampão de Tris salino (PBS) sob agitação à temperatura ambiente durante 1 hora.

Em seguida, retirou-se a solução de bloqueio e foram acrescentados os anticorpos primários Anti-AnxA2 (0034400, Invitrogen), Anti-Ck10 (MAB3003, Abnova) e Anti-Actina (AC-74, Sigma), utilizados na proporção 1:500. A membrana foi incubada por 16 horas a 4°C sob agitação. No dia seguinte, lavou-se a membrana 5 vezes com PBS com posterior incubação com anticorpo secundário Anti-Mouse (Sigma) e Anti-Rabbit (Sigma) na proporção 1:1000 conjugados à enzima HRP (Peroxidase de rabanete), à temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação. Finalizou-se o processo com a lavagem da membrana com TBS e visualização da marcação por quimioluminescência (reagentes de detecção ECL ® GE HealthCare em filmes autorradiográficos (GE HealthCare). A solução de ECL foi colocada sobre a membrana de modo a cobrir a sua totalidade, sendo mantida por cerca de 1-5 minutos. Após eliminar o excesso da solução, a membrana foi incubada com filme autorradiográfico o qual foi posteriormente revelado e fixado por meio de soluções de revelação de autoradiografias (GE HealthCare) para a identificação das bandas proteicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

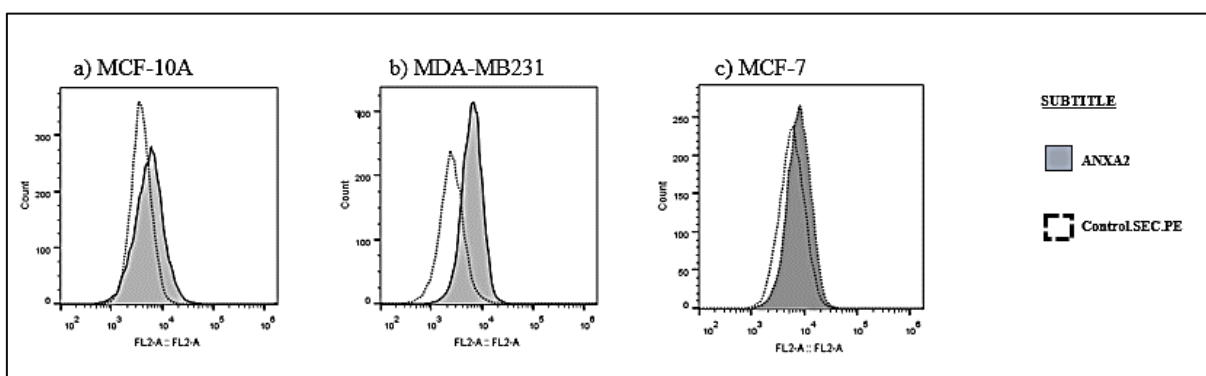
O CM é uma doença heterogênea e complexa, com diferentes subtipos moleculares. O TN ainda permanece pobremente compreendido, o que demanda esforços voltados para sua melhor caracterização. Não há marcadores específicos para o CMTN e a busca e validação dessas moléculas têm se mostrado preponderantes na definição de novas abordagens voltadas para essas pacientes. Em um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, a Ck10 e a AnxA2 foram identificadas em linhagens de CMTN. Considerando a Ck10, sua alta expressão tem sido utilizada como biomarcador em saliva para o diagnóstico de câncer oral escamoso (MU et al., 2014). A superexpressão de AnxA2 já foi descrita em células MDA-MB231 (FLODROVA et al., 2016), contudo, não há relatos da correlação entre ambas no CMTN. Este estudo objetivou avaliar a expressão total da AnxA2 e Ck10 assim como fracionada no núcleo, membrana/citoplasma e sobrenadante das linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231 para, assim, melhor caracterizar essas moléculas no CMTN. Novos caminhos poderão ser abertos visando uma classificação mais detalhada desse subtipo tumoral preocupante e que carece de estratégias mais efetivas de tratamento.

Nos ensaios de Citometria de Fluxo, verificou-se a expressão total de ambas proteínas. Esta é uma metodologia multiparamétrica amplamente utilizada por possibilitar o estudo morfológico, fenotípico e funcional de populações celulares, detecção de biomarcadores, além de uma análise qualitativa e quantitativa da expressão de antígenos (MARTINS; GAGLIANI; 2008). A imunofenotipagem, realizada neste estudo, possibilita a caracterização e a diferenciação das células por meio da detecção da fluorescência emitida pelos fluorocromos de acordo com a dispersão da luz no equipamento. Após a separação celular individual é conduzida a análise e a qualificação das micropartículas suspensas em fluxo, em meio líquido (NAKAGE et al., 2005). Na oncologia, a análise citométrica de fluxo possui uma aplicação ímpar, ao possibilitar o estudo de mecanismos moleculares que regulam a tumorigênese, além de permitir identificar marcadores biológicos com aplicação diagnóstica, prognóstica e terapêutica. Além disso, esta metodologia fornece informações mais sensíveis e objetivas com precisão sobre a taxa proliferativa de células tumorais em relação aos dados fornecidos pela histologia tradicional (LIN et al., 2014).

A AnxA2 tem se destacado como um potencial marcador oncogênico em diferentes tumores, incluindo o CM (GRINDHEIM et al., 2017). Além disso, pesquisas demonstraram uma estreita relação entre o nível de expressão da AnxA2 e a progressão e a invasão celulares em câncer de pulmão e de ovário (WANG et al., 2017) e em células do CM (SHARMA et al., 2010). Os estudos de Gibbs; Vishwanatha (2018), na busca por preditores de progressão tumoral para o CMTN, relataram que a expressão aumentada de AnxA2 está associada a

desfechos clínicos desfavoráveis e pior prognóstico, com sobrevidas global e livre de doença reduzidas. Hipotetizamos que sua expressão seria maior em células de CMTN e, conforme figura 4, observou-se uma diferença entre os picos obtidos após análise das marcações. O método de quantificação adotado considerou os níveis proteicos totais e a AnxA2 também tem sido descrita em diferentes compartimentos celulares desempenhando funções-chave conforme sua localização. Shetty et al., (2012), também descreveram o papel da AnxA2 como marcador de progressão do CM, quando localizada na superfície celular. Valapala; Vishwanatha (2011), afirmaram também que essa proteína, quando em superfície, conduz à degradação da matriz extracelular, promovendo o processo de migração e invasão de células tumorais. Interessantemente, Chaudhary et al., (2014), observaram que as células epiteliais não tumorigênica, apresentam uma baixa expressão de AnxA2 na membrana. Estes dados sugerem que, em células de CMTN, a AnxA2 é encontrada na superfície coordenando eventos tumorais preditores de agressividade.

Figura 4- Análise de citometria de fluxo comparando a expressão de Anexina A2 (AnxA2) entre diferentes linhagens celulares mamárias. (A) MCF-10A; (B) MDAMB231 e (C) MCF7

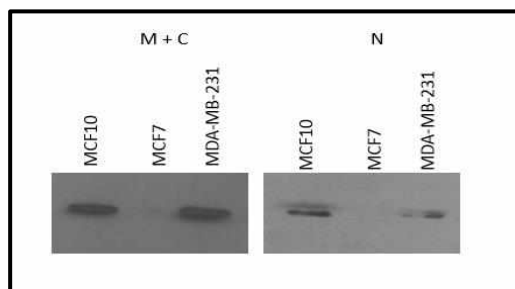


Fonte: Próprio autora, 2020

Realizamos, portanto, a extração das proteínas celulares em duas frações: (i) citoplasma/ membrana e (ii) núcleo e avaliamos a expressão por Western Blotting. Esta é uma poderosa ferramenta que pode ser usada para identificar e fornecer informações sobre os níveis de expressão de proteínas a partir da especificidade dos anticorpos utilizados. É um procedimento importante para a imunodeteção (KURIEN; SCOFIELD, 2015). O fracionamento proteico realizado neste estudo permitiu um melhor entendimento da localização e expressão das proteínas de interesse e, portanto, sugere diferentes funções desempenhadas nos compartimentos celulares. Como demonstrado na Figura 5, a AnxA2 tem, de fato, uma expressão peculiar entre os subtipos moleculares do CM conforme a fração analisada. Sua expressão não foi detectada na linhagem MCF-7 no núcleo e

citoplasma/membrana, se mostrando intensa nas linhagens MCF-10A e MDA-MB231, ambas triplo- negativas.

Figura 5- Expressão de Anexina A2 (AnxA2) nas frações proteicas obtidas do citoplasma/membrana (M+C) e do núcleo (N) das linhagens celulares mamárias MCF-10A, MCF7 e MDA-MB-231.



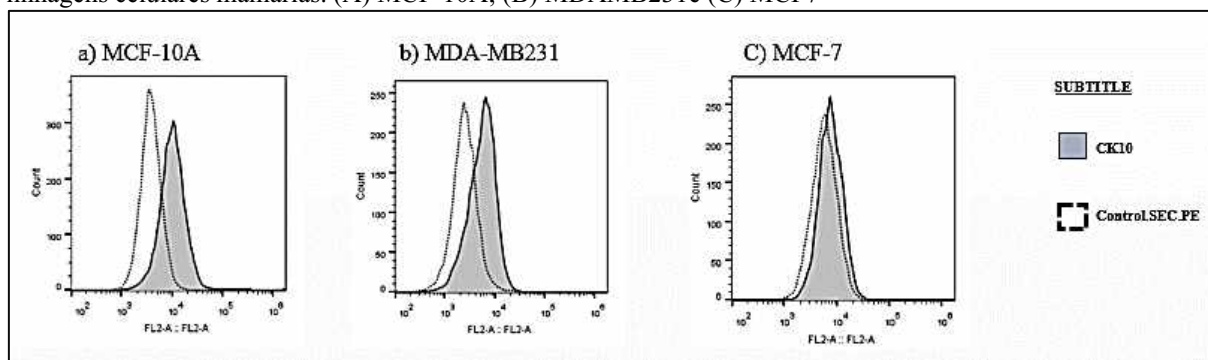
Fonte: Próprio autora, 2020

Na membrana plasmática, a expressão da AnxA2 é responsável pela manutenção da homeostase, regulando a reparação mediada pelo plasminogênio e a degradação da matriz extracelular (HITCHCOCK et al., 2014). Segundo Myrvang et al., (2013), a diferença na expressão de AnxA2 entre as linhagens MDAMB -231 e MCF-7 encontra-se correlaciona com o comportamento metastático do modelo TN. Wu et al., (2012), também observaram que, quando supreeexpressavam AnxA2, células MCF-7 se tornavam altamente proliferativas e migratórias, aumentando sua capacidade metastática. Já o papel da AnxA2 no núcleo de células tumorais ainda é pobremente compreendido. Madureira et al., (2012), sugeriram e descreveram em seus estudos que a AnxA2 pode se acumular no núcleo após a exposição das células a diferentes agentes genotóxicos, desempenhando, assim, um efeito protetor ao DNA contra danos oxidativos. Em neoplasias, a expressão nuclear de AnxA2 protege as células tumorais de agentes genotóxicos, como quimioterápicos, cooperando para um fenótipo de resistência, mais agressivo e com um prognóstico desfavorável (HITCHCOCK et al., 2014). Portanto, nossos resultados corroboram com estudos anteriores. De fato, a AnxA2 tem sido associada a eventos oncogênicos-chave como angiogênese, proliferação, apoptose, migração, invasão e adesão celulares. Além disso, há indícios de sua interação com outras proteínas que desempenham papel importante no ambiente tumoral, cooperando para a promoção de metástase do câncer (LOKMAN et al., 2011).

Em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa foi sugerida uma correlação entre a AnxA2 e a Ck10 no CMTN. Portanto, também avaliamos, no presente estudo, a expressão de Ck10 nas diferentes linhagens celulares. A expressão de Ck10 bem como seu papel no CM ainda não foram descritos. Sabe-se que essa proteína compõe os filamentos intermediários do

citoesqueleto de células epiteliais, regulando diferentes funções, sobretudo relacionadas à motilidade. Mutações em Ck10 e sua baixa expressão já foram relacionadas a distúrbios da epiderme (MÜLLER et al., 2006). Alguns estudos já relataram sua ação como supressora tumoral ao inibir a proliferação celular de queratinócitos (PARAMIO et al., 2001; SANTOS et al., 2002; PALKÓ, 2018). No ensaio de citometria de fluxo, os resultados evidenciam uma maior expressão de Ck10 nas linhagens MCF10-A e MDA-MB231 (Figura 6).

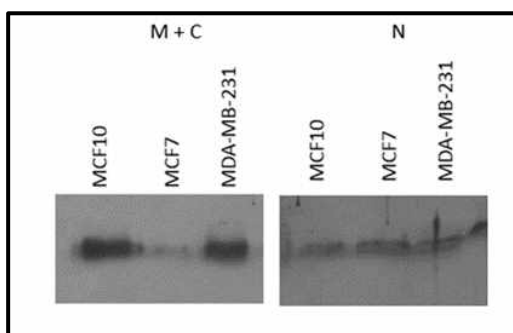
Figura 6- Análise de citometria de fluxo comparando a expressão de Citoqueratina 10 (Ck10) entre diferentes linhagens celulares mamárias. (A) MCF-10A; (B) MDAMB231 e (C) MCF7



Fonte: Próprio autora, 2020

Atualmente, sugere-se que um dos principais mecanismos responsáveis pela progressão do CM é o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal, no qual há a perda de características epiteliais pelas células tumorais que adquirem, então características invasivas (KOKKINOS et al., 2007; VALEJO, 2010). Como citoqueratinas encontram-se relacionadas a esse processo, também se mostrou importante avaliar a expressão de Ck10 em diferentes frações proteicas. Interessantemente, uma menor expressão de Ck10 foi observada na fração citoplasma/membrana da linhagem MCF-7 (Figura 7). Para o núcleo não houve diferença entre as linhagens. Também não houve marcação para AnxA2 e Ck10 no sobrenadante das células estudadas (dados não demonstrados).

Figura 7- Expressão de Citoqueratina 10 (Ck10) nas frações proteicas obtidas do citoplasma/membrana (M+C) e do núcleo (N) das linhagens celulares mamárias MCF-10A, MCF7 e MDA-MB-231.



Fonte: Próprio autora, 2020

De acordo com Koch e Roop (2004) e Paramio et al. (1999) é importante salientar que a Ck10 está entre as proteínas mais prevalentes nas células suprabasais da epiderme normal. Sua presença inibe a proliferação e a progressão do ciclo celular dos queratinócitos (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009). Contudo, em um estudo prévio de Yang et al., (2008), a expressão de Ck10 foi detectada em uma linhagem celular metastática de carcinoma hepatocelular, não identificada em uma linhagem menos agressiva, um comportamento similar ao demonstrado por nossos resultados, nos quais a maior expressão de Ck10 foi observada nas frações da membrana e citoplasma da linhagem triplo negativa. Acreditamos que o provável papel desempenhado pela ck10 no citoplasma celular de tumores mamários esteja correlacionado com a agressividade da lesão e pode ser um fator prognóstico nesses tumores.

Outras citoqueratinas também apresentam esse comportamento. Stathopoulou et al., (2002), detectaram uma maior expressão de Ck19 em pacientes com CM metastático, sendo essa também considerada um marcador desfavorável. Ck5 e Ck14 também apresentam esse comportamento. Consideradas citoqueratinas basais, Ck5, Ck6 e CK14 são correlacionadas com um pior prognóstico e menor taxa de sobrevida das pacientes com CM (LAAKSO et al., 2005; RIJN et al., 2002; EL-REHIM et al., 2004; GUSTERSON et al., 2005). Contudo, a expressão diferencial e o papel funcional desempenhado pela Ck10 no CM ainda não foram descritos. Nosso estudo, portanto, é pioneiro e sugere a relação da Ck10 com o CMTN.

5 CONCLUSÃO

Verificou-se uma expressão diferencial das proteínas AnxA2 e Ck10 nos extratos proteicos totais e em diferentes compartimentos celulares (membrana/citoplasma e núcleo) das linhagens mamárias MCF-10A (não-tumorigênica), MCF-7 (tumoral com fenótipo luminal) e MDA-MB231 (tumoral com fenótipo triplo-negativo). Observou-se uma maior expressão de AnxA2 nas frações celulares das linhagens triplo-negativas. Já a Ck10 se mostrou mais expressa apenas no citoplasma e membrana dessas células. Nosso estudo é pioneiro em demonstrar a expressão de Ck10 no CM, mas ensaios adicionais devem ser

conduzidos para a completa avaliação da relação da expressão dessa proteína com o tumor mamário. Ademais nossos resultados permitirão o direcionamento de novas abordagens voltadas para esse subtipo tumoral e propiciará novos caminhos visando uma classificação mais detalhada do CMTN que carece de estratégias mais efetivas de tratamento.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JUNIOR, Hiram Larangeira de. Citoqueratinas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 135-145, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962004000200002>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962004000200002&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 02 ago. 2020.
- ALVES, D A. **Mapeamento de epítomos baseado em peptídeos na caracterização do anticorpo FabC4**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.811>. Acesso em: 02 ago. 2020.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures**, 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html>. Acesso em: 20 de maio 2018.
- AMENDOLA, Luís.C.B.; VIEIRA, Roberto. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.51, n.4, p.325-330, set. 2005. Disponível em: https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_51/v04/pdf/revisao3.pdf. Acesso em: 02 ago. 2020.
- AQUINO, R. G. F. et al. Invasive ductal carcinoma: relationship between pathological characteristics and the presence of axillary metastasis in 220 cases.: relationship between pathological characteristics and the presence of axillary metastasis in 220 cases. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 163-170, abr. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-69912017002010>. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rcbc/v44n2/pt_0100-6991-rcbc-44-02-00163.pdf. Acesso em: 02 ago. 2020.
- BAPTISTA, M. Z. et al. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. **Human Pathology**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 78-84, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.006>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817715003433>. Acesso em: 02 ago. 2020.

BARONZIO, G. et al. A Brief Overview of Hyperthermia in Cancer Treatment. **Journal Of Integrative Oncology**, [s.l.], v. 03, n. 01, p. 115-125, 2014. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6771.1000115>. Disponível em: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/a-brief-overview-of-hyperthermia-in-cancer-treatment.php-2329-6771.1000115.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2020.

BARRAL, M. et al. Percutaneous Thermal Ablation of Breast Cancer Metastases in Oligometastatic Patients. **Cardiovascular and Interventional Radiology**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 885-893, 9 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00270-016-1301-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00270-016-1301-x#citeas>. Acesso em: 02 ago. 2020.

BHARADWAJ, A. et al. Annexin A2 Heterotetramer: structure and function. : Structure and Function. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 6259-6305, 19 mar. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14036259>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/6259>. Acesso em: 02 ago. 2020.

BRAGULLA, Hermann H.; HOMBERGER, Dominique G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, [s.l.], v. 214, n. 4, p. 516-559, abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>. Acesso em: 02 ago. 2020.

BRASIL, **Instituto nacional de câncer (INCA)**. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em: 20 maio 2018.

BRYANT, H. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. **Nature**, [s.l.], v. 434, n. 7035, p. 913-917, abr. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03443>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature03443>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CALABRESE, C. R. et al. Anticancer Chemosensitization and Radiosensitization by the Novel Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitor AG14361. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 96, n. 1, p. 56-67, 6 jan. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djh005>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article/96/1/56/2520751>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CÂNCER de Mama. **Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM)**, 2017. Disponível em: <https://www.sbmastologia.com.br/medicos/wp-content/uploads/2018/03/C%C3%A2ncer-de-Mama-Consenso-da-SBM-Regional-Piau%C3%AD-2017.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2020.

CÂNCER e fisiologia da Mama. **Associação Médica Brasileira (AMB)**. Disponível em: https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/cancer-de-mama-diagnostico-e-tratamento.pdf. Acesso em: 20 maio 2018.

CARVALHO, M. T. **Avaliação de fatores prognósticos em tumores de mama nos estádios 2A e 3B e sua correlação com sobrevida**. 99 f. Tese de doutorado (programa de oncologia). Universidade de São Paulo. 2010. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-27092010-123550/fr.php>. Acesso em 02 ago. 2020.

CASTALDO, S. et al. Annexin A2 Regulates AKT Upon H₂O₂-Dependent Signaling Activation in Cancer Cells. **Cancers**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 492, 7 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11040492>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6520733/>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CHAUDHARY, P. et al. Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies. **British Journal of Cancer**, [s.l.], v. 111, n. 12, p. 2328-2341, 16 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.542>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264449/>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CHEUNG, K. J. et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 7, p. 854-863, 1 fev. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1508541113>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4763783/>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CHRISTENSEN, M. et al. Annexin A2 and cancer: a systematic review: A systematic review. **International Journal of Oncology**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 5-18, 8 nov. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2017.4197>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2017.4197>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CHOATE, K. A. et al. Mitotic Recombination in Patients with Ichthyosis Causes Reversion of Dominant Mutations in KRT10. **Science**, [s.l.], v. 330, n. 6000, p. 94-97, 26 ago. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1192280>. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/330/6000/94>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CHUNG, B. et al. Identification of Novel Interaction between Annexin A2 and Keratin 17. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 287, n. 10, p. 7573-7581, 10 jan. 2012. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.301549>. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3293598/>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CHUTHAPISITH, S.et al. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. **International Journal of Oncology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 1545-1551, 1 jun. 2007. Spandidos Publications.
<http://dx.doi.org/10.3892/ijo.30.6.1545>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17487377/>. Acesso em: 02 ago. 2020.

CLARKE M. et al. EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. : an overview of the randomised trials. **The Lancet**, [s.l.], v. 366, n. 9503, p. 2087-2106, dez. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67887-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67887-7). Disponível em:
<https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673605678877/fulltext>. Acesso em: 02 ago. 2020.

COELHO, A.S.et al. Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review.: literature review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s.l.], v. 50, n. 1, p. 1-1, abr. 2018. Revista Brasileira de Analises Clinicas.
<http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.201800615>. Disponível em:
<http://www.rbac.org.br/artigos/predisposicao-hereditaria-ao-cancer-de-mama-e-sua-relacao-com-os-genes-brca1-e-brca2-revisao-da-literatura>. Acesso em: 02 ago. 2020.

COLDITZ, G. A.; BOHLKE, K.; BERKEY, Catherine S.Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. : prevention must also. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s.l.], v. 145, n. 3, p. 567-579, 13 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-2993-8>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-014-2993-8>. Acesso em: 02 ago. 2020.

DAMIANI, Durval; DAMIANI, Daniel. Manejo farmacológico da baixa estatura: o papel dos inibidores da aromatase: o papel dos inibidores da aromatase. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 83, n. 5, p. 1-1, nov. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0021-75572007000700008>. Disponível em:
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572007000700008&lang=pt. Acesso em: 02 ago. 2020.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, 30 [s.l.], v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 30 out. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6611>. Disponível em:
<https://cancerres.aacrjournals.org/content/68/21/8643>. Acesso em: 02 ago. 2020.

EL-REHIM, D. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **The Journal of Pathology**, [S.L.], v. 203, n. 2, p. 661-671, 7 maio 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1559>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.1559>. Acesso em: 02 ago. 2020.

EVANS, E. E. et al. C35 (C17orf37) is a novel tumor biomarker abundantly expressed in breast cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s.l.], v. 5, n. 11, p. 2919-2930, nov. 2006. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-06-0389>. Disponível em: <https://mct.aacrjournals.org/content/5/11/2919>. Acesso em: 02 ago. 2020.

FLODROVA, D. et al. A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. **General Physiology and Biophysics**, [s.l.], v. 35, n. 03, p. 387-392, 2016. AEPress, s.r.o. http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2016009. Disponível em: http://www.elis.sk/download_file.php?product_id=4815&session_id=0f8nc2a1n7vg828f9cpd85e714. Acesso em: 02 ago. 2020.

GIBBS, L.D.; VISHWANATHA, J.K. Prognostic impact of AnxA1 and AnxA2 gene expression in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 2697-2704, 23 dez. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23627>. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/23627/text/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

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. **Annals of Oncology**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 1736-1747, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdr304>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419384145>. Acesso em: 03 ago. 2020.

GREENLEE, H. et al. Clinical practice guidelines on the evidence-based use of integrative therapies during and after breast cancer treatment. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 67, n. 3, p. 194-232, 24 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21397>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21397>. Acesso em: 03 ago. 2020.

GRINDHEIM, A. K. et al. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 1861, n. 11, p. 2515-2529, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416517302830?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

GUSTERSON, B.A. et al. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast Cancer Research**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 143-148, 5 maio 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr1041>. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/>. Acesso em: 31 jul. 2020.

HENNESSY, B.T. et al. Biphasic metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast. **Annals of Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 605-613, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdl006>. Disponível em: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)57571-8/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)57571-8/fulltext). Acesso em: 03 ago. 2020.

HERRMANN, Harald et al. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 562-573, jul. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2197>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm2197>. Acesso em: 03 ago. 2020.

HILDEBRANDT, B et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 33-56, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00179-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00179-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842801001792?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

HITCHCOCK, J. K. et al. Dynamic reciprocity: the role of annexin a2 in tissue integrity. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 125-133, 20 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-014-0231-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12079-014-0231-0>. Acesso em: 03 ago. 2020.

HON J.D. et al. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. **Am J Cancer Res**. 2016 Sep 1;6(9):1864-1872. PMID: 27725895; PMCID: PMC5043099. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5043099/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

INSTITUTO ONCOGUIA (ONCOGUIA), **Câncer**, Brasil 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/cancer-home/cancer-de-mama/20/12/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), **Breast cancer**, França 2019. Disponível em: <https://www.iarc.fr/?s=breast+cancer>. Acesso em: 03 ago. 2020.

JOENSUU, K. et al. ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early and Late Relapsing Breast Cancer—Reduced CK5 Expression in Metastases. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, [S.L.], v. 7, p. 23-34, jan. 2013. SAGE Publications.

<http://dx.doi.org/10.4137/bcbcr.s10701>. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579427/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KABOS, P. et al. Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S.L.], v. 128, n. 1, p. 45-55, 28 jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-010-1078-6>. Disponível em:
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-010-1078-6>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KARANTZA, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. **Oncogene**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 127-138, 4 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.456>. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/onc2010456>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KIM, M et al. Cytokeratin expression profile in gastric carcinomas. **Human Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 576-581, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2003.12.007>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0046817704000413?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KIM, S.W. et al. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 by Annexin I. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 19, p. 15712-15719, 7 fev. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m009905200>. Disponível em:
<https://www.jbc.org/content/276/19/15712>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KOCH, P.J.; ROOP, D. R. The Role of Keratins in Epidermal Development and Homeostasis—Going Beyond the Obvious. **Journal of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 123, n. 5, p. 5-11, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202x.2004.23495.x>. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-202X\(15\)32024-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-202X(15)32024-8). Acesso em: 14 set. 2020.

KOKKINOS, M.I. Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations in vitro and in vivo. **Cells Tissues Organs**, [S.L.], v. 185, n. 1-3, p. 191-203, 2007. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000101320>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17587825/>. Acesso em: 14 ago. 2020.

KOHLER, C. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 105-113, 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-8-105>. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1476-4598-8-105.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2020

KPETEMEY, M. MIEN1, a novel interactor of Annexin A2, promotes tumor cell migration by enhancing AnxA2 cell surface expression. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 156-169, 15 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12943-015-0428-8>. Disponível em: <https://molecularcancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0428-8>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KURIEN, B.T.; SCOFIELD, R.H. Western Blotting: an introduction. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 17-30, 2015. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26043986/>. Acesso em: 14 set. 2020.

KUSHWAHA, P. P. et al. Emerging Role of Migration and Invasion Enhancer 1 (MIEN1) in Cancer Progression and Metastasis. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 868, p. 1-13, 4 set. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00868>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6738349/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

LOKMAN, N.A et al. The Role of Annexin A2 in Tumorigenesis and Cancer Progression. **Cancer Microenvironment**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 199-208, 5 mar. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12307-011-0064-9>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21909879/>. Acesso em: 14 ago. 2020.

LAAKSO, M. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to brca1 tumors. **Modern Pathology**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 1321-1328, 1 jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800456>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/3800456>. Acesso em: 03 ago. 2020.

LAJUS, T. B.P. A utilização de inibidores de PARP na profilaxia e no tratamento do câncer de mama deficiente no gene BRCA1. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 252-256, 1 jan. 2010. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v9i3.5167>. Disponível em: <https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5167>. Acesso em: 03 ago. 2020.

LANE, E.B et al. Keratins and skin disorders. **The Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 204, n. 4, p. 355-366, 19 out. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1643>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1643>. Acesso em: 03 ago. 2020.

LIN, Y. et al. The application of flow cytometry for evaluating biological aggressiveness of intracranial meningiomas. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, [s.l.], v. 88, n. 5, p. 312-319, 19 nov. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21202>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.b.21202>. Acesso em: 03 ago. 2020.

LIU, X. et al. Iniparib Nonselectively Modifies Cysteine-Containing Proteins in Tumor Cells and Is Not a Bona Fide PARP Inhibitor. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 510-523, 29 nov. 2011. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-1973>. Disponível em: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/2/510.long>. Acesso em: 02 ago. 2020.

MADUREIRA, P. A. et al. Genotoxic Agents Promote the Nuclear Accumulation of Annexin A2: role of annexin a2 in mitigating dna damage. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 50591, 30 nov. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050591>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050591>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MAI, J. et al. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1477, n. 1-2, p. 215-230, mar. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00274-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00274-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167483899002745?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MAKINO, T. et al. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. **British Journal of Cancer**, [s.l.], v. 101, n. 8, p. 1298-1306, 15 set. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605313>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/660531>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MAROTTI, J.D. et al. Triple-Negative Breast Cancer. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 187, n. 10, p. 2133-2138, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.05.018>. Disponível em: [https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(17\)30291-2/fulltext](https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(17)30291-2/fulltext). Acesso em: 03 ago. 2020.

MARTINS, D. M.; GAGLIANI, L.H. IMPORTÂNCIA DACITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa - Ruep**, Santos-Sp, v. 8, n. 5, p. 1-20, jun. 2008. Trimestral. Disponível em: <http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/39/u2008v5n8e39>. Acesso em: 14 ago. 2020.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H.. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s.l.], v. 11, p. 151-164, abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/bctt.s176070>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/epidemiological-characteristics-of-and-risk-factors-for-breast-cancer-peer-reviewed-article-BCTT>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MÜLLER, F.B. et al. A human keratin 10 knockout causes recessive epidermolytic hyperkeratosis. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 1133-1141, 27 fev. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl028>. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/15/7/1133/715392>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MUSSUNOOR, S.; MURRAY, G. The role of annexins in tumour development and progression. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 216, n. 2, p. 131-140, out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2400>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.2400>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MYRVANG, H.K. et al. Protein interactions between surface annexin A2 and S100A10 mediate adhesion of breast cancer cells to microvascular endothelial cells. **Febs Letters**, [s.l.], v. 587, n. 19, p. 3210-3215, 27 ago. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.012>. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2013.08.012>. Acesso em: 03 ago. 2020.

NAKAGE, A.P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 966-973, ago. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782005000400040>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a40v35n4.pdf>. Acesso em: 14 set. 2020.

NANASHIMA, N. et al. Hair keratin KRT81 is expressed in normal and breast cancer cells and contributes to their invasiveness. **Oncology Reports**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 2964-2970, 11 abr. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2017.5564>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5564>. Acesso em: 14 ago. 2020.

NGUYEN, T.; HATTERY, E.; KHATRI, V.P. **Radiofrequency ablation and breast cancer: a review**. *Gland Surg*. 2014;3(2):128–135. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2014.03.05. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25083506/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

PALKÓ, E. et al. Analysis of KRT1, KRT10, KRT19, TP53 and MMP9 expression in pediatric and adult cholesteatoma. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 1-12, 18 jul. 2018. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200840>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0200840>. Acesso em: 03 ago. 2020.

PARAMIO, J. M. et al. Inhibition of Protein Kinase B (PKB) and PKC ζ Mediates Keratin K10-Induced Cell Cycle Arrest. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 21, n. 21, p. 7449-7459, 1 nov. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.21.21.7449-7459.2001>. Disponível em: <https://mcb.asm.org/content/21/21/7449>. Acesso em: 03 ago. 2020.

PLANES-LAINE, G. et al. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: the first clinical evidences are emerging. a literature review. : The First Clinical Evidences Are Emerging. A Literature Review. **Cancers**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 1033-1033, 22 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11071033>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1033>. Acesso em: 03 ago. 2020.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 117, n. 13, p. 2631-2639, 1 jun. 2004. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01245>. Disponível em: <https://jcs.biologists.org/content/117/13/2631>. Acesso em: 03 ago. 2020.

RIJN, M. V. et al. Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 161, n. 6, p. 1991-1996, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64476-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64476-8). Disponível em: [https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(10\)64476-8/fulltext](https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(10)64476-8/fulltext). Acesso em: 03 ago. 2020.

SAAD, E. D. et al. Aromatase inhibitors in breast cancer: from metastatic disease to adjuvant treatment. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2002, 48(4): 555-567. Disponível em: https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_48/v04/revisao1.html. Acesso em: 13 ago. 2020.

SAFADI, R. A. et al. Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, [s.l.], v. 99, p. 1-8, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.12.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996918306575?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SANTOS, M. et al. The Expression of Keratin K10 in the Basal Layer of the Epidermis Inhibits Cell Proliferation and Prevents Skin Tumorigenesis. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 21, p. 19122-19130, 11 mar. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m201001200>. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/277/21/19122>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SARKAR, S. et al. Targeted therapy against EGFR and VEGFR using ZD6474 enhances the therapeutic potential of UV-B phototherapy in breast cancer cells. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 122, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-12-122>. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-12-122>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SATO, T. et al. Prolactin suppresses a progesterin-induced CK5-positive cell population in luminal breast cancer through inhibition of progesterin-driven BCL6 expression. *Oncogene*,

[s.l.], v. 33, n. 17, p. 2215-2224, 27 maio 2013. **Springer Science and Business Media LLC**. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.172>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2013172>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SCHNEIDER, R. et al. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in post-menopausal female patients: an update. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s.l.], p. 113, out. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/bctt.s22905>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/aromatase-inhibitors-in-the-treatment-of-breast-cancer-in-post-menopau-peer-reviewed-article-BCTT>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SHARMA, M. R. et al. Antibody-directed targeting of angiostatin's receptor annexin II inhibits Lewis Lung Carcinoma tumor growth via blocking of plasminogen activation: possible biochemical mechanism of angiostatin's action. **Experimental And Molecular Pathology**, [s.l.], v. 81, n. 2, p. 136-145, out. 2006a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.03.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480006000244?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

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. **Experimental and Molecular Pathology**, [s.l.], v. 81, n. 2, p. 146-156, out. 2006b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.03.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480006000256?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SHARMA, M.; OWNBEY, R.T.; SHARMA, M. C. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. **Experimental and Molecular Pathology**, [s.l.], v. 88, n. 2, p. 278-286, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.01.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480010000110?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SHARMA, P. et al. Keratin 19 regulates cell cycle pathway and sensitivity of breast cancer cells to CDK inhibitors. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 10 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-51195-9>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-51195-9>. Acesso em: 03 ago. 2020.

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**, [s.l.], v. 7, n. 9, p. 44299-44311, 5 set. 2012. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044299>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0044299>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SOUZA, K.C.; MOHALLEM, N.D.S.; SOUSA, E. M. B. Mesoporous silica-magnetite nanocomposite: facile synthesis route for application in hyperthermia. **Journal Of Sol-gel Science And Technology**, [s.l.], v. 53, n. 2, p. 418-427, 24 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10971-009-2115-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10971-009-2115-y>. Acesso em: 03 ago. 2020.

STATHOPOULOU, A. et al. Molecular Detection of Cytokeratin-19–Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients With Operable Breast Cancer: evaluation of their prognostic significance. **Journal of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 20, n. 16, p. 3404-3412, 15 ago. 2002. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2002.08.135>. Disponível em: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2002.08.135>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SYED, S. P. et al. Angiostatin receptor annexin II in vascular tumors including angiosarcoma. **Human Pathology**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 508-513, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2006.09.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0046817706005764?via%3Dihub>. Acesso em: 03 ago. 2020.

TAVASSOLI F.A; EUSEBI V. **Tumors of the mammary gland**. AFIP Atlas of Tumor Pathology. Fourth Series, American Registry of Pathology, Washington, 2009. ISBN-13: 978-1933477053.

TYANOVA, S. et al. Proteomic maps of breast cancer subtypes. **Nature Communications**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 4 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10259>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms10259>. Acesso em: 03 ago. 2020.

UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER (UICC). **TNM. Classificação de Tumores Malignos. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer**. 6ª edição, 2004. Disponível em: <https://www.uicc.org>. Acesso em: 03 ago. 2020.

VALAPALA, M.; VISHWANATHA, J. K. Lipid Raft Endocytosis and Exosomal Transport Facilitate Extracellular Trafficking of Annexin A2. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 286, n. 35, p. 30911-30925, 7 jul. 2011. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.271155>. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/286/35/30911>. Acesso em: 03 ago. 2020.

VALEJO, F.A. M. **Transição epitélio-mesenquimal e presença de células CD44+/CD24- como fatores de predição de metástase axilar no câncer de mama inicial**. 2010. 100 F. Dissertação (Mestrado em Ciências médicas) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto,

2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17145/tde-18102010-151920>. Acesso em: 03 ago. 2020

WANG, C.Y. et al. Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. **Disease Markers**, [S.L.], v. 2014, p. 1-10, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308976>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925611/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

WARD, L.S. et al. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 351-360, ago. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302002000400006>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302002000400006&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 03 ago. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 20 maio de 2018.

WU, B. et al. Up-regulation of Anxa2 gene promotes proliferation and invasion of breast cancer MCF -7 cells. **Cell Proliferation**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 189-198, 27 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00820.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6495230/>. Acesso em: 14 ago. 2020.

XU, X.H. et al. Association of annexin A2 with cancer development (Review). **Oncology Reports**, [s.l.], v. 33, n. 5, p. 2121-2128, 5 mar. 2015. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2015.3837>. Disponível em <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2015.3837>. Acesso em: 03 ago. 2020.

YANG, L.; ZHANG, S.; WANG, G. Keratin 17 in disease pathogenesis: from cancer to dermatoses. **The Journal of Pathology**, [s.l.], v. 247, n. 2, p. 158-165, 7 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.5178>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.5178>. Acesso em: 03 ago. 2020.

YANG, X. et al. Cytokeratin 10 and Cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 12, p. 3850-3859, 15 jun. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4338>. Disponível em: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/12/3850>. Acesso em: 03 ago. 2020.

ZHAI, H. et al. Annexin A2 Promotes Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. **Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 31, n. 40, p. 14346-14360, 5 out. 2011. Society for. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3201988/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

