

**JOÃO NUNES DE MATOS NETO**

**ANÁLISE DA CORRELAÇÃO CLÍNICA COM O PERFIL DE EXPRESSÃO  
DE GENES CODIFICADORES DE METILTRANSFERASES DA FAMÍLIA SETD EM  
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

**BRASÍLIA, 2015**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JOÃO NUNES DE MATOS NETO**

**ANÁLISE DA CORRELAÇÃO CLÍNICA COM O PERFIL DE EXPRESSÃO  
DE GENES CODIFICADORES DE METILTRANSFERASES DA FAMÍLIA SETD EM  
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da  
Saúde pelo programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Fábio Pittella Silva

Co-Orientador: Doralina do Amaral Rabello Ramos

Brasília

2015

*Dedico este trabalho à toda minha família, especialmente às minha filhas Luiza e Gabriela e à minha esposa Mônica, pelos preciosos momentos roubados durante esta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pelo inconformismo da espécie humana. Agradeço à Universidade de Brasília por prover a estrutura necessária para a realização deste trabalho assim como agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro do mesmo. Agradeço aos pacientes por gentilmente consentirem o uso de partes de si neste estudo. Agradeço ao Serviço de Mastologia do Hospital de Base do Distrito Federal e do Hospital Universitário de Brasília por terem sido parceiros na coleta de material cirúrgico. Agradeço ao serviço de Oncologia do Hospital Universitário de Brasília, especialmente aos médicos residentes de Oncologia. Agradeço ao Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Brasília e aos colegas do laboratório Lâmina, especialmente ao Dr. Marcos Segura, por ajudarem no processamento das amostras tumorais. Agradeço ainda a todos os professores e alunos do laboratório de Farmacologia Molecular e do laboratório de Patologia Molecular do Câncer pelo convívio enriquecedor. Agradeço especialmente ao professor Fábio Pittella por franquear suas bancadas a um clínico de formação e por acreditar nos frutos desta parceria e agradeço também especialmente à colega Doralina Rabello, a Dora de todos nós do laboratório, minha fiel amiga escudeira e confidente de angústias científicas. Agradeço ao professor Diego pela ajuda nas análises estatísticas deste estudo. Agradeço aos colegas do Cettro – Centro de Câncer de Brasília, por facilitarem minha vida durante este momento, destacando aqui a enfermeira Karla Lúcia, pelo apoio aos meus pacientes, e à coordenadora da recepção Sheila Eugênio. Agradeço aos colegas do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário de Brasília por entenderem minha ausência, em especial às coordenadoras Ludmila e Valéria e aos colegas da Mederi Saúde Domiciliar por me darem o suporte necessário nas minhas ausências. Agradeço à Dra. Marcela Cammarota por administrar nosso consultório particular na minha longa ausência.

Agradeço ainda aos meus pais pela formação do meu caráter e aos meus irmãos pelo apoio, mesmo que silencioso, em todos os momentos.

Agradeço e peço desculpas à minha esposa Mônica e às minhas filhas Luiza e Gabriela, pelos momentos que eu deixei de viver com elas.

## RESUMO

O câncer de mama ainda continua sendo uma epidemia mundial, com taxas importantes de incidência e prevalência no mundo todo. De forma geral, a taxa de mortalidade do câncer de mama gira em torno de 15% nos países desenvolvidos e em torno de 40% nos países em desenvolvimento em 05 anos. Vários fatores de risco tem sido identificados na gênese do câncer de mama. Nenhuma isolada, porém, explica de forma completa, a carcinogênese do câncer de mama. A classificação do câncer de mama em subtipos moleculares, baseada no perfil de expressão de receptores hormonais e no receptor do HER-2 trouxe uma base racional para o tratamento desta doença. Mutações em alguns genes supressores tumorais, como o BRCA-1 e BRCA-2, além do p53 e PTEN, tem papel relevante conhecido na transformação tumoral da célula mamária normal. Vários tumores, porém, não apresentam alterações nestes genes. Por outro lado, alterações epigenéticas têm se mostrado cada vez mais relevantes na gênese de vários tumores. Estas alterações têm como característica básica não causar modificações na sequência do DNA, mas promover expressão seletiva dos genes dependente do nível do empacotamento do DNA, com áreas de eucromatina frouxa, que permitem mais facilmente a transcrição gênica, e áreas de heterocromatina, que dificultam a transcrição. Dentre os efetores epigenéticos de maior relevância estão as enzimas metiltransferases, capazes de promover a metilação das histonas. Desregulação na expressão ou atividade destas enzimas estão entre as principais alterações epigenéticas envolvidas na carcinogênese. A família *SETD* é uma família de metiltransferases composta por 10 genes que codificam proteínas com domínio SET. Este domínio está envolvido na metilação de resíduos de lisina em histonas e proteínas não-histonas. Até o momento, pouco se sabe sobre a relação de genes da família *SETD* com a carcinogênese mamária. No presente estudo foi realizada a avaliação de expressão relativa de todos os genes da família *SETD* em amostras de tecidos tumorais e normais de pacientes portadoras de câncer de mama através de técnica de PCR em tempo real. O perfil de expressão comparativa desta família de genes foi correlacionado com as informações clínico-patológicas de maior relevância prognóstica, disponíveis das pacientes. Posteriormente realizamos avaliação imunohistoquímica em lâmina de microarranjo de tecidos. Notamos que o gene *SETMAR*

encontra-se significativamente hiperexpresso nas amostras tumorais quando comparadas às amostras normais de pacientes com câncer de mama. Quando avaliamos apenas as pacientes com perfil imuno-histoquímico do tipo triplo negativo, comparadas com as amostras normais, há novamente uma hiperexpressão relativa do gene *SETMAR*. Os genes *SETD5* e *SETD8* encontram-se hiperexpressos em tumores com mais de 10 linfonodos positivos para metástase de câncer de mama, além de estarem também hiperexpressos nas pacientes com estadiamento acima do estágio IIB. Além disso, há uma significativa correlação na expressão de ambos os genes no pool de amostras tumorais. O gene *SETD8* encontra-se ainda hiperexpresso em pacientes que apresentam invasão angiolinfática. Outro gene que se apresentou significativamente alterado é o *SETD1B*, cuja expressão está aumentada nos tecidos tumorais comparados aos tecidos normais em amostras pareadas. Entre as amostras tumorais pareadas também foi verificada uma estreita correlação de co-expressão dos genes *SETD1B*, *SETD5*, *SETD8*, *SETMAR*. Analisados em conjunto, estes dados apontam para o provável papel dos genes *SETMAR* e *SETD1B* na carcinogênese mamária, com implicações clínicas relevantes, além de um possível envolvimento dos genes *SETD5* e *SETD8* em estádios mais avançados da doença. A correlação da expressão gênica de alguns membros da família *SETD* com fatores clínicos prognósticos em câncer de mama abre o caminho para explorá-los não só como alvos terapêuticos, mas também como novos marcadores prognósticos.

Palavras-chave: família *SETD*, expressão gênica, câncer de mama.

## ABSTRACT

Breast cancer still remains a global epidemic, with significant rates of incidence and prevalence worldwide. Overall, their mortality rate is around 15 % in developed countries and around 40 % in developing countries in 05 years. Several risk factors have been identified in the genesis of breast cancer, but no one alone, explains the carcinogenesis of breast cancer. The classification of breast cancer in molecular subtypes based on the expression profile of hormone receptors and HER -2 receptor has brought a rational basis for treatment of this disease. Mutations in tumor suppressor genes, such as *BRCA-1* and *BRCA-2*, *p53* and *PTEN*, plays an important role in the tumor transformation of normal breast cells. However, not all breast tumors carry changes in these genes. Epigenetic alterations have recently been recognized to play an important role in the genesis of many tumor types. These changes are characterized by not causing any kind of mutations in the DNA sequence but by inducing selective expression of genes dependent on the the DNA packaging level, with areas of loose euchromatin, allowing more easily gene transcription, and areas of heterocromatin, that hamper transcription. Among the most relevant epigenetic effectors, the methyltransferases enzymes are capable of promoting histone methylation. Dysregulation in the expression or activity of these enzymes is among the major epigenetic alterations involved in carcinogenesis. The *SETD* family is a family of methyltransferases composed of 10 genes encoding proteins with SET domain. This domain is involved in the methylation of lysine residues on histones and non-histone proteins. So far, little is known about the relation of *SETD* family genes with mammary carcinogenesis. In the present study we evaluated the relative expression of all *SETD* family genes in breast tumor samples and non-tumor breast tissues of patients with breast cancer by real time q-PCR. The comparative expression profile of each gene of this family was correlated with the most relevant clinicopathologic prognostic information, available from patients. We note that there is a significant overexpression of the gene *SETMAR* in tumor samples compared to normal samples from patients with breast cancer. When we evaluated only patients with immunohistochemical profile of the triple negative type, compared with the normal samples, we observed again a significant overexpression of *SETMAR*. The *SETD5* and *SETD8* genes are overexpressed in tumors with more than 10 positive

lymph nodes for breast cancer metastasis, and also are overexpressed in patients with advanced stage. Furthermore, there is a significant correlation in expression of both genes in pool of tumor samples. The *SETD8* gene is still overexpressed in patients with angiolymphatic invasion. Another gene that is significantly changed is the *SETD1B*, whose expression is increased in tumor tissues compared to corresponding normal tissues samples. The paired tumor samples also showed a close correlation of co-expression of genes *SETD1B*, *SETD5*, *SETD8*, *SETMAR*. Taken together, these data point to the likely role of *SETMAR* and *SETD1B* genes in mammary carcinogenesis, with relevant clinical implications, and possible involvement of *SETD5* and *SETD8* genes in more advanced stages of the disease. The correlation of gene expression of some members of the *SETD* family with clinical prognostic factors in breast cancer opens the way to exploit them not only as therapeutic targets, but also as a new prognostic markers.

Keywords: *SETD* gene family, expression profile, breast cancer

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As seis características adquiridas do câncer .....	21
Figure 2 - Modelo dos passos da carcinogênese em câncer de mama.....	23
Figura 3 - Estrutura do Nucleossomo.....	24
Figura 4 – Modelo esquemático de alteração estrutural na cromatina.....	25
Figura 5 Esquema mostrando a captação dos fragmentos de amostras clínicas.....	36
Figure 6 - Tamanho das amostras tumorais .....	45
Figura 7- Relação entre invasão angiolímfática e porcentagem de linfonodos acometidos ...	47
Figura 8 Expressão relativa do <i>SETMAR</i> entre tecido tumoral e normal.....	48
Figure 9- Expressão comparativa do <i>SETMAR</i> entre tecido tumoral triplo negativo .....	49
Figure 10 - Expressão relativa do <i>SETD8</i> e invasão angiolímfática .....	50
Figura 11 - Expressão comparativa e número de linfonodos acometidos.: <i>SETD5</i> .....	51
Figura 12 - Expressão comparativa e número de linfonodos acometidos: <i>SETD8</i> .....	51
Figura 13 – Expressão relativa dos genes <i>SETD5</i> e <i>SETD8</i> e estadiamento .....	52
Figura 14 - Expressão relativa do <i>SETD1B</i> em amostras pareadas de câncer de mama....	52
Figura 15 – Regressão Linear entre o <i>pool</i> de amostras tumorais .....	53
Figura 16 – Correlação da expressão dos genes <i>SETD1B</i> e <i>SETD5</i> entre amostras pareadas .....	54
Figura 17 - Correlação da expressão dos genes <i>SETD1B</i> e <i>SETD8</i> entre amostras pareadas de tecidos tumorais e normais. ....	54
Figura 18 - Correlação da expressão dos genes <i>SETD1B</i> e <i>SETMAR</i> entre amostras pareadas. ....	55
Figura 19 - Correlação da expressão dos genes <i>SETD5</i> e <i>SETD8</i> entre amostras pareadas .....	55
Figura 20 - Correlação da expressão dos genes <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> entre amostras pareadas. ....	55
Figura 21 – Regressão Linear entre os genes <i>SETD5</i> e <i>SETMAR</i> em amostras tumorais que apresentam CDIS associado ao componente invasivo.....	56
Figura 22 – Avaliação imuno-histoquímica da proteína SETD1B .....	57
Figura 23 – Avaliação imuno-histoquímica da proteína SETD8.....	57
Figura 24 – Avaliação imuno-histoquímica do SETD5 .....	58
Figura 25 – Avaliação imuno-histoquímica do SETMAR.....	58

Figura 26 – SETMAR - Avaliação comparativa de sobrevida e expressão relativa. ....	62
Figura 27 – Representação esquemática da variação do SETD8 no ciclo celular.....	64
Figura 28 – Imuno-histoquímica SETD5: tecido normal e carcinoma <i>in-situ</i> – <i>The Human Protein Atlas</i> .....	65
Figura 29 – Modelo de participação coordenada dos genes da família SETD em câncer de mama .....	66
Figura 30 - Expressão relativa dos genes <i>SETD1A</i> até o gene <i>SETD5</i> entre amostras tumorais e normais.....	75
Figura 31 - Expressão relativa dos genes <i>SETD6</i> até o gene <i>SETD8</i> entre amostras tumorais e normais.....	75
Figura 32 - Expressão comparativa dos genes da família SETD entre amostras tumorais triplo negativos e amostras normais.. ..	76
Figura 33 - Expressão relativa dos genes da família SETD e invasão angiolinfática. ....	76

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Estadiamento do câncer de mama simplificado.....	16
Tabela 2 - Incidência de câncer de mama por subtipo .....	17
Tabela 3 - Elementos de uma laudo de biópsia de câncer de mama .....	18
Tabela 4 - Incidência dos subtipos moleculares de câncer de mama.....	19
Tabela 5 - Modificações pós-traducionais das caudas de histona .....	24
Tabela 6 - Modificações pós-traducionais das caudas de histona .....	26
Tabela 7 – Metilttransferases: substratos alternativos de proteínas não-histonas .....	28
Tabela 8 – Localização, ação enzimática e provável papel na carcinogênese da família <i>SETD</i> . .....	29
Tabela 9 - Distribuição das amostras na lâmina MAT .....	38
Tabela 10 - Idade, lateralidade e estadiamento do câncer de mama das pacientes .	40
Tabela 11 - Características das biópsias das pacientes com câncer de mama.....	41
Table 12 - Avaliação da invasão angiolinfática e perineural e necrose tumoral.....	42
Tabela 13 - Relação entre número de linfonodos acometidos e invasão angiolinfática e perineural .....	43
Tabela 14 – Perfil imuno-histoquímico das amostras tumorais .....	44

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Comitte on Cancer
BI-RADS	Breast Image Reporting and Data System
CD	Carcinoma Ductal
cDNA	DNA complementar
CL	Carcinoma Lobular
CM	Câncer de mama
CO2	Dióxido de carbono
CT	Cycle threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FISH	Teste de imuno-fluorescência in situ
H3K27	Lisina 27 da histona 3
H3K36	Lisina 36 da histona 3
H3K4	Lisina 4 da histona 3
H3K79	Lisina 79 da histona 3
H3K9	Lisina 9 da histona 3
H4K20	Lisina 20 da histona 4
H4K20me3	Trimetilação da lisina 20 da histona 4
H4K5	Lisina 5 da histona 4
HBDF	Hospital de Base do Distrito Federal
HER-2	Receptor do crescimento epidérmico HER2/neu
Hme1	Monometilação de histidina
HMTase	Metiltransferase de histona
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto do Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Kme1	Monometilação de lisina
Kme2	Dimetilação de lisina
Kme3	Trimetilação de lisina
MPT	Modificações pós-traducionais
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRMT	Família de metiltransferases de arginina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RE	Receptor de estrógeno
RH	Receptor de Hormônio
Rme1	Monometilação de arginina
Rme2a	Dimetilação assimétrica de arginina
Rme2s	Dimetilação simétrica de arginina
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RQ	Quantificação relativa
SAM	s-adenosilmetionina
shRNA	RNA short hairpin
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 O CÂNCER DE MAMA.....	16
1.1.1 Epidemiologia .....	16
1.1.2 Detecção precoce e diagnóstico.....	16
1.1.3 Estadiamento.....	17
1.1.4 Laudo Histopatológico e Classificação Histopatológica.....	18
1.1.5 Subtipos Moleculares.....	19
1.1.6 Carcinogênese e Câncer de Mama .....	20
1.1.7 Epigenética e alterações pós-traducionais em histonas .....	23
1.1.8 As Metiltransferases de Histonas.....	27
1.1.9 A Família SETD .....	29
<b>Objetivos .....</b>	<b>34</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3. Métodos .....</b>	<b>35</b>
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS NORMAL E TUMORAL .....	35
3.2 EXTRAÇÃO DO RNA.....	36
3.3 PCR EM TEMPO REAL (qPCR) .....	37
<b>3.4 ANÁLISES DOS DADOS DE PCR EM TEMPO REAL .....</b>	<b>38</b>
3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	39
3.6 PESQUISA IN SILICO .....	40
3.6 ASPECTOS ÉTICOS .....	41
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 CARACTERÍSTICA CLÍNICO-PATOLÓGICA DAS PACIENTES .....	42
4.2 ESTUDOS DE EXPRESSÃO RELATIVA.....	48
4.2.1 Expressão Relativa dos Genes da Família SETD nas Amostras de Tecidos Tumorais de Câncer de Mama quando Comparados às Amostras dos Tecidos Normais .....	48
4.2.2 Expressão Relativa da Família SETD em Amostras Teciduais Tumorais do Sub-tipo Triplo Negativo .....	49
4.2.3 Expressão dos Genes da Família SETD em Tumores que Apresentam Invasão Angiolinfática.....	50
4.2.4 Relação da Expressão dos genes SETD5 e SETD8 e Número de Linfonodos Acometidos e Estadiamento .....	51
4.2.5 O Gene SETD1B e Amostras Pareadas de Câncer de Mama.....	53

4.3 ESTUDOS DE CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	54
4.3.1 SET5 e SETD8 : Correlação em Pool de Amostras Tumorais .....	54
4.3.2. Estudo de Correlação nas Amostras Pareadas .....	55
4.3.3 Estudo da correlação em amostras tumorais com presença do componente in situ .....	57
4.4. ESTUDOS DE EXPRESSÃO PROTÉICA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	57
<b>Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>69</b>
7 REFERÊNCIAS .....	70
8 APÊNDICE .....	76

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 O CÂNCER DE MAMA**

#### **1.1.1 Epidemiologia**

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo, sendo o câncer mais freqüente entre as mulheres, com aproximadamente 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012 ( 25% de todos os cânceres) e em torno de 522 mil mortes anuais (1)

A taxa de incidência é mais alta na América do Norte, Austrália, Nova Zelândia, na Europa Ocidental e no norte da Europa, com as menores taxas na Ásia e África Subsaariana (2, 3).

Estas diferenças internacionais estão provavelmente relacionados com mudanças sociais, como resultado da industrialização, mudanças na ingestão de gordura, peso, idade da menarca, padrões reprodutivos, como menor número de gravidezes e idade mais avançada no primeiro parto (3).

No Brasil, segundo Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou-se 57.120 novos casos de câncer em 2014 com 13.591 mortes entre as mulheres no ano de 2012 por esta doença(4)

#### **1.1.2 Detecção precoce e diagnóstico**

Em países com programas de rastreamento e detecção precoce, a maioria dos pacientes são diagnosticadas numa fase assintomática, cuja única manifestação clínica é a mamografia alterada. Entretanto, em torno de 15% das mulheres, o diagnóstico é feito em consequência da palpação de nódulo mamário e em torno de

30% o diagnóstico é feito por manifestações clínicas que aparecem no intervalo entre duas mamografias (5).

O diagnóstico final do câncer de mama é dado através do estudo citológico ou histopatológico de parte ou do total de uma lesão suspeita.

### 1.1.3 Estadiamento

Após o diagnóstico estabelecido do câncer de mama é realizado o estadiamento do tumor. O estadiamento tem como objetivo definir a extensão local e sistêmica da doença, estabelecendo padrões de prognósticos e estratégias de tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado no mundo é o sistema da American Joint Committee on Cancer (AJCC). Este sistema é baseado na análise retrospectiva da sobrevida de diversas amostras de pacientes com diagnóstico de câncer de mama em vários estádios da doença, refletindo ainda os métodos clínicos de avaliação e os tratamentos aplicados nestas amostras de pacientes. São feitas, ainda, revisões periódicas que visam absorver os novos conceitos tecnológicos de avaliação e tratamento. A última revisão do estadiamento foi publicada na sua 7ª edição (6) e apresenta sua classificação resumida segundo a tabela 1.

Tabela 1 - Estadiamento do câncer de mama simplificado

Estadio	Descrição
Estádio 0	Tumor <i>in situ</i> (não invasivo).
Estádio I	Tumor de até 2cm, sem macrometástase de linfonodos.
Estádio IIA	Tumor de até 2 cm e até 3 linfonodos axilares ou tumor de até 5cm, sem comprometimento de linfonodos
Estádio IIB	Tumor de até 5cm com comprometimento de até 3 linfonodos ou tumor maior que 5cm, sem comprometimento de linfonodos.
Estádio IIIA	Tumor maior que 5cm com comprometimento linfonodal ou 4 a 9 linfonodos comprometidos independente do tamanho do tumor
Estádio IIIB	Tumor invade parede do tórax ou pele com até 9 linfonodos comprometidos
Estádio IIIC	Dez ou mais linfonodos comprometidos OU linfonodo supraclavicular (qualquer tamanho de tumor).

---

 Adaptado de : AJCC 7<sup>a</sup> edição

#### 1.1.4 Laudo Histopatológico e Classificação Histopatológica

A maioria dos cânceres de mama são provenientes do componente epitelial da mama e são denominados carcinomas. Embora discutidos de forma conjunta, como um único grupo de doença, os carcinomas de mama são, na verdade uma variedade de lesões que podem apresentar diferenças microscópicas e comportamentos biológicos diversos (7).

O carcinoma de mama invasivo é inicialmente dividido em duas grandes categorias : carcinomas ductais (CD) e carcinomas lobulares (CL). Esta classificação baseia-se muito mais no padrão de crescimento e características citológicas do que no aspecto anatômico da mama ( ducto e lóbulo) e engloba vários subtipos histológicos. Existe uma incidência distinta destes subtipos como mostrado na tabela 2, sendo que 76% são do tipo carcinoma ductal invasivo sem nenhum componente especial, 8% são do tipo carcinoma lobular invasivo sem nenhum componente especial (7)

Tabela 2 - Incidência de câncer de mama por subtipo

Subtipo de Tumor	Porcentagem (%)
Ductal Infiltrante	76
Lobular Invasivo	8
Misto - ductal e invasivo	7
Mucinoso colóide	2,4
Tubular	1,5
Outros	5

Fonte: Li e colaboradores , 2005 (8).

Segundo o Colégio Americano de Patologia (8), existe um conjunto de informações mínimas que devem estar explícitas num laudo histopatológico de uma

amostra tumoral de um câncer de mama como exposto na tabela 3. Quando presentes, estes fatores permitem inferências sobre fatores prognósticos e tomadas de decisão clínica .

### 1.1.5 Subtipos Moleculares

Após estabelecido o diagnóstico do câncer de mama, é fundamental a análise do perfil de expressão dos receptores celulares. Todo paciente deve ter sua amostra tumoral de mama avaliada quanto a expressão de receptores hormonais (RH) de estrógenos (RE) e progesterona ( RP) e da expressão do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). Esta avaliação é feita através de estudo imuno-histoquímico para RE e RP e através de estudo imuno-histoquímica e teste de imuno-fluorescência *in situ* (FISH) para HER-2 (9). Esta classificação tem importância prognóstica e terapêutica através do uso de estratégias que possam bloquear estes receptores (10).

Tabela 3 - Elementos de uma laudo de biópsia de câncer de mama

<b>Laudo Histopatológico</b>
Tipo histológico do componente invasivo
Tamanho do maior componente invasivo
Grau histológico com nota final avaliando os três elementos abaixo
Diferenciação glandular / tubular
Pleomorfismo glandular
Taxa de mitose
Multifocalidade
Presença de carcinoma ductal <i>in situ</i> e suas características
Invasão de pele, auréola e músculo esquelético
Margens
Linfonodos avaliados
Linfonodos acometidos
Efeito do tratamento neoadjuvante
Invasão linfo-vascular
Estadiamento patológico

Fonte: Lester e col., 2009 (9).

Após esta análise os cânceres de mama são classificados em 03 subtipos moleculares . Esta classificação serve como uma ferramenta eficaz na escolha do tratamento da paciente. Além de auxiliar na avaliação da necessidade da quimioterapia no tratamento adjuvante, esta classificação ajuda na escolha de

drogas alvo-moleculares que serão associadas ao tratamento quimioterápico. Existe uma incidência diferente destes subtipos moleculares (10) como mostrado na tabela 4.

Tabela 4 - Incidência dos subtipos moleculares de câncer de mama

<b>Subtipo Molecular</b>	<b>%</b>
RE e RP positivos	80
HER-2 positivo	23
Triplo Negativo	13%

<b>Subtipo HER-2</b>	<b>%</b>
HER-2 positivo e HR positivo	67%
HER-2 positivo e RH negativo	23%

Fonte: O'Brien, 2010 (11)

### 1.1.6 Carcinogênese e Câncer de Mama

Depois de 25 anos de rápidos avanços, a pesquisa em câncer gerou um rico e complexo conjunto de conhecimento (11-18). Para simplificar uma literatura demasiadamente complicada, Hanahan e Weinberg propuseram em 2000 os *hallmarks* do câncer. Estas características compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento de cânceres humanos. Os *hallmarks* constituem um princípio organizador para racionalizar as complexidades da doença neoplásica maligna. Elas incluem: 1) manutenção da sinalização proliferativa, levando a proliferação crônica de células, sendo a proliferação desenfreada a mais fundamental das características de células cancerígenas; 2) inibição de supressores de crescimento; 3) resistência à morte celular; 4) imortalidade replicativa; 5) indução da angiogênese, sem a qual o tumor não teria como se nutrir, evitando assim sua progressão; 6) ativação de invasão e metástase, que ocorre em tumores malignos (19) (figura 1).

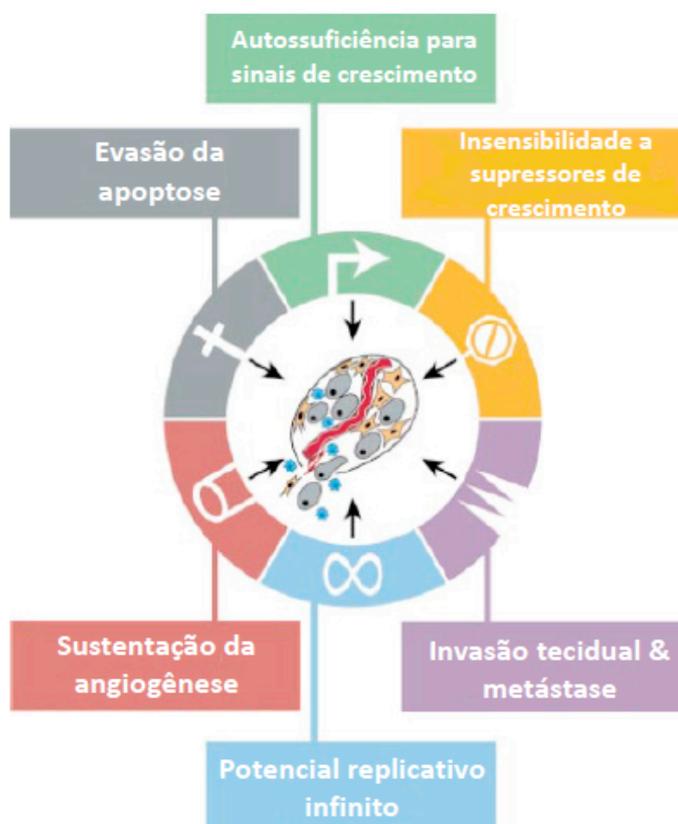


Figura 1 - As seis características adquiridas do câncer, propostas por Hanahan e Weinberg em 2000. Adaptado de (20)

O progresso conceitual da última década adicionou ainda duas características emergentes na lista de caracterização do câncer proposta em 2000: reprogramação do metabolismo energético e escape do sistema imunológico (21).

O câncer de mama, apesar de apresentar todas as características acima, vem sendo amplamente estudado e, a despeito da grande quantidade de pesquisas já conduzidas sobre a patologia, sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida, sendo a mesma atribuída a uma interação de fatores que, de certa forma, são considerados determinantes no desenvolvimento da doença (22-24).

Dentre os vários fatores de risco para câncer de mama conhecidos, o gênero, a idade e a história de câncer de mama familiar são provavelmente os fatores de risco mais conhecidos e cientificamente comprovados.

O câncer de mama é 100 vezes mais comum em mulheres que em homens. Nos Estados Unidos da América (EUA) mais de 200.000 mulheres são diagnosticadas anualmente com câncer de mama enquanto apenas em torno de

2000 casos acontece na população masculina (2).

O risco de desenvolvimento de câncer de mama também cresce proporcionalmente à idade (25), sendo que 1 em cada 203 mulheres tem risco de desenvolvimento de câncer de mama até os 39 anos de idade com risco saltando para 1 em cada 15 mulheres na idade de 70 anos ou mais de idade.

Altos índices de massa corporal e aumento de peso no período da perimenopausa tem sido consistentemente atribuídos a um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama entre as mulheres na pós-menopausa (26-31).

Fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher também já estão bem estabelecidos, como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos (aumentando ainda mais quando esta gestação é acima dos 35 anos), uso de terapia hormonal na menopausa. Além desses, também já estão bem definidos como fatores de risco no desenvolvimento desta neoplasia a exposição à radiação ionizante (particularmente quando na formação rápida da mama), algumas doenças de mama benigna prévia e fatores relacionados com estilo de vida, como dieta (existe correlação entre a incidência de câncer de mama e dieta rica em gordura), álcool (4, 24) e sedentarismo (32). Apesar destes fatores de risco bem estabelecidos, 2/3 das mulheres com câncer de mama não apresentam nenhum destes fatores mencionados(33).

A história familiar de CM está associada a um aumento de risco de duas vezes ou mais para o desenvolvimento desta neoplasia, se o afetado é um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) cujo CM desenvolveu-se antes dos 50 anos; quanto mais cedo o parente desenvolveu CM, maior o risco. Apesar de importante, CM familiar corresponde a apenas 5-10% do total de casos . Genes identificados como de grande importância no contexto de CM familiar são o *BRCA1* e *BRCA2*, *p53* e *PTEN* (4, 32). Contudo, em torno de 2/3 das pacientes diagnosticadas com câncer de mama não apresentam nenhuma das características acima(33).

A relação entre fatores somáticos, predisposição genética e evolução de uma célula normal para uma célula tumoral é complexa. Beckmann e Bender, num estudo clássico de carcinogênese em câncer de mama, tentaram sistematizar os vários passos da carcinogênese e racionalizar os vários achados descritos na literatura. Estes autores propuseram um modelo de interação entre fatores hormonais, oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de adesão e proliferação, assim

como fatores pró-angiogênicos(33). Estes achados estão resumidos na figura 2.

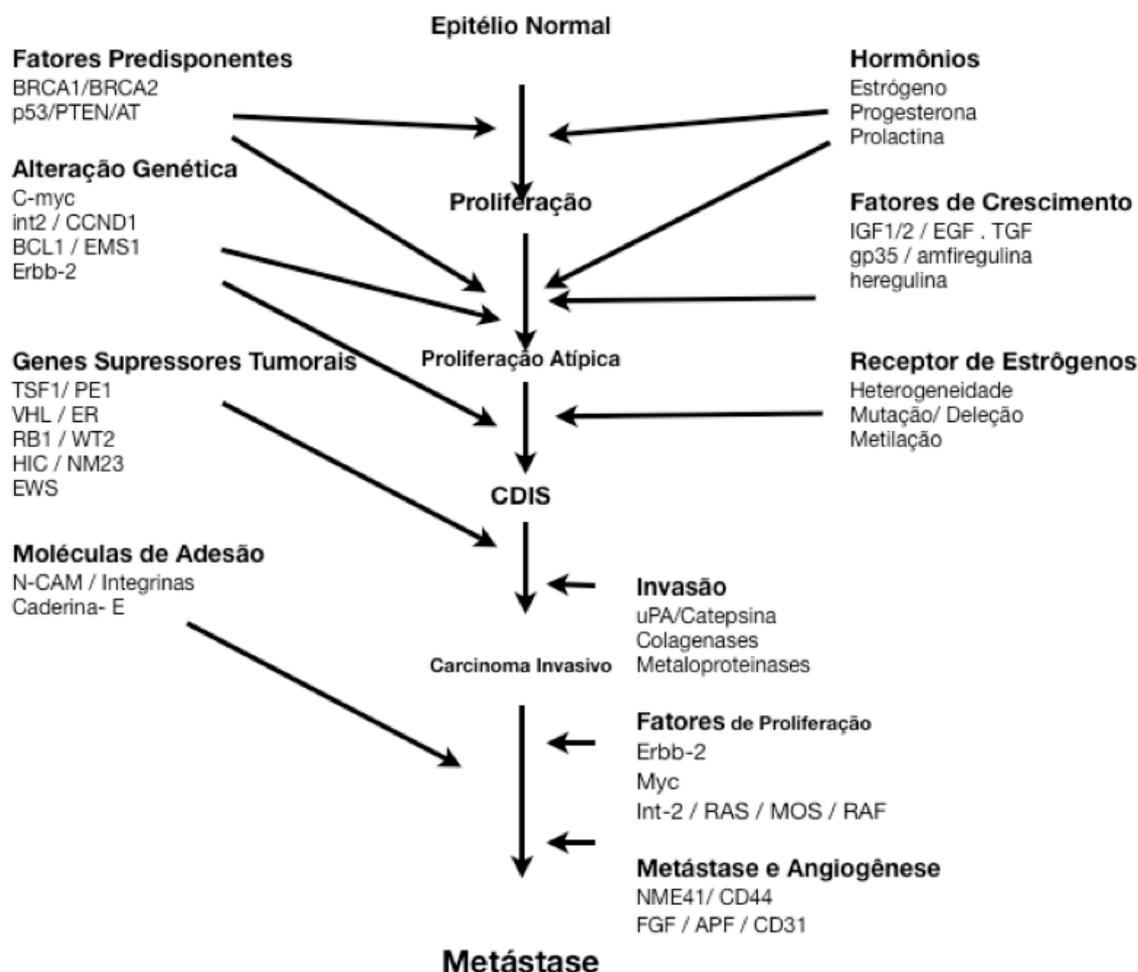


Figure 2 - Modelo dos passos da carcinogênese em câncer de mama. Adaptado de Beckmann e Bender (33). CDIS – Carcinoma Ductal *in Situ*

Mesmo com todos os avanços no tratamento cirúrgico e no tratamento clínico do CM, a sobrevivência média em 5 anos fica em torno de 85% nos países desenvolvidos e em torno de 60% nos países em desenvolvimento (4). O CM continua sendo um problema de saúde pública mundial.

### 1.1.7 Epigenética e alterações pós-traducionais em histonas

Nos núcleos de todos os organismos eucarióticos, o material genômico apresenta-se altamente compactado por proteínas histonas e não-histonas, num polímero dinâmico chamado de cromatina. O correto processo de desenvolvimento de qualquer organismo requer a manutenção de padrões da expressão gênica; esta

atividade genômica é dependente da viabilidade do repertório de fatores de transcrição e do nível de empacotamento do ácido desoxirribonucléico (DNA) dentro desta cromatina. As regiões altamente condensadas da cromatina, as heterocromatinas, são ditas como regiões inertes à transcrição; regiões menos condensadas e, portanto, transcricionalmente ativas, são chamadas de eucromatina. Proteínas envolvidas na regulação da estrutura e condensação da cromatina atuam, portanto, como importantes determinantes no processo de desenvolvimento (34-36).

Os diferentes níveis de organização da cromatina são dependentes da organização das unidades fundamentais da cromatina, os nucleossomos. Um nucleossomo consiste em aproximadamente 147 pares de base de DNA enroladas ao redor de um núcleo central composto por um octâmero de proteínas denominadas proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (34-37). Este octâmero é formado por um tetrâmero de H3-H4 e dois dímeros de H2A-H2B. As histonas são proteínas de caráter básico, constituídas de um domínio globular e um N-terminal mais flexível e carregado (cauda da histona), que se projeta para fora do nucleossomo. É no domínio N-terminal das histonas formadoras de cada octâmero que as diversas modificações químicas acontecem (35, 38)(figura 3).

Allfrey e colaboradores na década de 1960 (39) apontaram a possibilidade da modificação pós-traducional das histonas modificadas. Através do estudo da estrutura da cromatina por raios x de alta resolução, Luger e colegas demonstraram que a estrutura da cromatina poderia ser modificada apenas com alterações na estrutura das histonas (40).

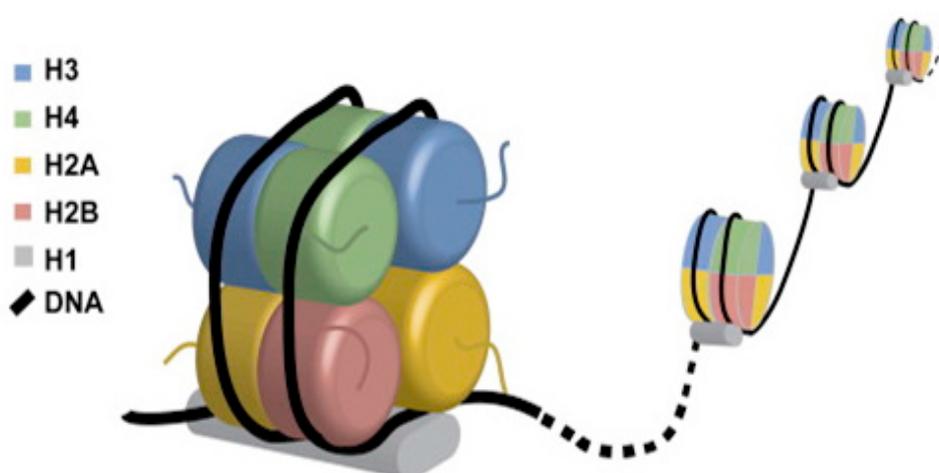


Figura 3 - Cento e quarenta e sete pares de bases de DNA estão envoltas num octâmero formado pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4. A histona H1 sela o octâmero separando cada unidade de um

nucleossomo de outro. As extremidade N-terminal de cada histona formadora dos núcleos ficam expostas e estão sujeitas a modificações pós-traducionais. Adaptado de Hamon (41)

Hoje se sabe que ações enzimáticas pós-traducionais nas caudas das histonas resultam em modificações altamente complexas, alterando as interações não-covalentes dentro e entre os nucleossomos. Estas modificações afetam a estrutura da cromatina e têm o potencial tanto para ativar quanto para reprimir a transcrição de determinado segmento genômico, através da "abertura" ou do "fechamento" dos locais de ancoragem da maquinaria de transcrição ou da modificação da "identificação" destes locais pela mesma maquinaria (Figura 4). Esta regulação epigenética depende do tipo de modificação química, do nível desta modificação e do sítio a ser modificado na histona. A esta regulação, dá-se o nome de o "Código das Histonas" (35, 36, 38, 42, 43) .

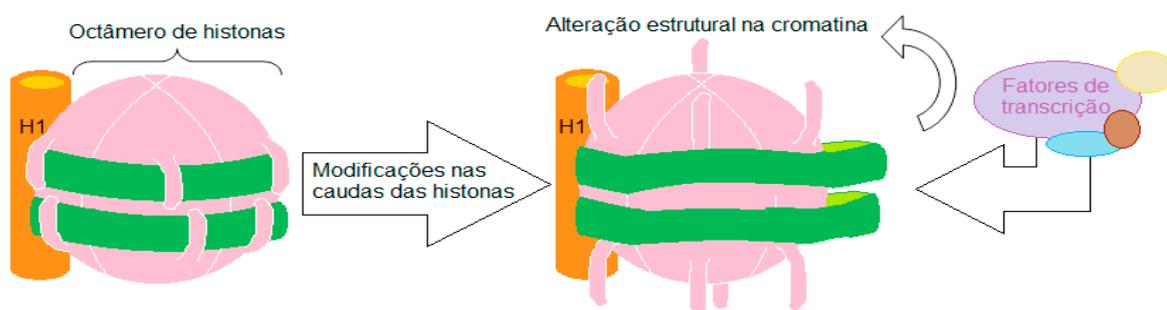


Figura 4 – Modelo esquemático de alteração estrutural na cromatina por modificações epigenéticas.. Adaptado de Pierce (44)

A epigenética é então definida como alterações da expressão gênica provocadas por mecanismos independentes de modificações na sequência primária do DNA , que são herdadas durante a divisão celular (45, 46)

Várias são classes e os níveis de modificações epigenéticas de histona descritas (47, 48), estando explicitadas na tabela 5.

Tabela 5 - Modificações pós-traducionais das caudas de histona

Tipo de Modificação	Nomenclatura
Acetilação	K-ac
Metilação (lisina)	K-me1, K-me2, K-me3
Metilação (arginina)	R-me1, R-me2s, R-me2a
Fosforilação (serina e treonina)	S-ph, T-ph
Fosforilação (tirosina)	Y-ph
Ubiquitinação	K-ub
Sumoilação	K-su
Ribosilação	ADP E-ar
Deiminação	R Cit
Isomeração de prolina	P-cis P-trans/
Crotonilação	K-cr
Propionilação	K-pr
Buirilação	K-bu
Formilação	K-fo
Hidroxilação	Y-oh
0-GlcAcilação	S-GlcNAc; T-GlcNAc

Legenda: me1, monometilação; me2, dimetilação; me3, trimetilação; me2s, dimetilação simétrica; , dimetilação assimétrica; e Cit, citrulina. Adaptado de Dawson; Kouzirades, 2012 (49).

As funções aberrantes da expressão genética e da estabilidade genômica podem acontecer em decorrência das alterações genéticas e epigenéticas e são os acontecimentos chave do câncer (50, 51) .

Os mecanismos epigenéticos são observados como uma capacidade flexível e adaptativa do genoma capazes de serem alterados em face de diversos estímulos (52). O conjunto das modificações epigenéticas, tratado como “epigenoma”, é característico a cada tipo celular e fornece mecanismos à diversidade e

diferenciação, por meio da regulação do acesso à informação genética para a maquinaria celular (53, 54).

A herança epigenética inclui a metilação do DNA, modificações pós traducionais em histonas e silenciamento mediado por ácido ribonucleico (RNA), e juntos representam mecanismos essenciais que permitem a propagação estável de estados de atividade gênica a partir de uma geração de células para outra (51).

Por serem alterações celulares reversíveis, as alterações epigenéticas são um potencial alvo terapêutico de silenciamento, com possibilidade de reversão do dano pós-traducional (51, 53, 55, 56).

A informação transmitida por meio das modificações epigenéticas podem desempenhar um papel crítico na regulação de todos os processos baseados no DNA, como transcrição, reparo no DNA e replicação. Conseqüentemente, padrões de expressão anormais ou alterações genômicas em reguladores da cromatina podem ter resultados profundos e pode levar à indução e manutenção de vários cânceres (46, 56-61).

### **1.1.8 As Metiltransferases de Histonas**

A metilação na cauda das histonas pode ocorrer em todos os resíduos básicos de aminoácidos: lisinas (K), argininas (R) e histidinas (H). As lisinas podem ser monometiladas (Kme1), dimetiladas (Kme2) ou trimetiladas (Kme3). As argininas podem ser monometiladas (Rme1) e dimetiladas simetricamente (Rme2s) ou assimetricamente (Rme2a). As histidinas foram reportadas estando monometiladas (Hme1), apesar de esta metilação ser um evento aparentemente raro e ainda não estar totalmente caracterizada (47). As complexidades nos tipos e níveis de metilação fornecem à esta modificação pós-traducional um potencial regulatório de grande importância uma vez que cada evento tem um efeito específico na estrutura da cromatina e na interação de proteínas regulatórias com a cromatina (48). A ação enzimática de adição de grupos metila a resíduos de histonas é catalisada pelas chamadas Metiltransferases de Histonas (do inglês, *HistoneMethyltransferase* - HMTase) e essa reação catalítica é feita através da transferência de grupos metil (CH<sub>3</sub>) dos doadores s-adenosilmetionina (SAM) (35, 62). As HMTase podem ser separadas em 3 grandes grupos: (A) proteínas contendo o domínio SET e (B) proteínas DOT1-like, que metilam resíduos de lisina, e (C) a família de

metiltransferases de arginina (do inglês, protein arginine N-methyltransferase - PRMT), que foi descrita como responsável pela metilação prioritária de argininas (62).

Em geral, a metilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4), H3K36, e H3K79 está relacionada à ativação gênica, enquanto a di- e trimetilação em H3K9, H3K27 e H4K20 estão relacionadas ao silenciamento gênico. A metilação de lisina também foi descrita modulando outros processos relacionados à cromatina, como replicação, recombinação e reparo de DNA (43, 63-69).

Muitas linhas de evidência sugerem que metilação aberrante de histonas pode ter papel na carcinogênese (51, 57, 70, 71). Estudos iniciais (47) mostraram que mudanças globais nos níveis de metilação de histona estão relacionadas ao aumento da recorrência de câncer e baixa sobrevida dos pacientes (Tabela 6).

Tabela 6 - Modificações pós-traducionais das caudas de histona

Tipo de Câncer	Alteração da MPT	Consequência
Câncer de próstata	↓ H3K4me2	Aumento de recorrência
	↓ H4K2me2	Aumento de recorrência
Câncer de pulmão	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
Câncer de Rim	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
Câncer de mama	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
	↓ H3K27me3	Piora na sobrevida
	↓ H4R3me2	Piores resultados clínicos
	↓ H4K20me3	Piores resultados clínicos
Câncer pancreático	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
	↓ H3K9me2	Piora na sobrevida
	↓ H3K27me3	Piora na sobrevida
Adenocarcinoma gástrico	↑ H3K9me3	Piora na sobrevida
Câncer ovariano	↓ H3K27me3	Piora na sobrevida
Linfomas	↓ H4K20me3	Associado com
Adenocarcinoma de cólon	↓ H4K20me3	Associado com

Legenda: Estudos correlacionados reportam padrões de metilação de histona alterados em tipos específicos de câncer. Adaptado de Greer, 2012 (47)

Além de sua função como metiltransferases de histona, foi demonstrado que algumas proteínas que contém o domínio SET também podem modificar proteínas não-histonas. Exemplos desta atividade são a metilação de p53 e de TAF-10 (TATA bindingprotein associated factor) pela SET7/9 (72, 73). Alguns outros exemplos estão listados na tabela 7.

A diversidade de substratos associados à cromatina e não associados à mesma constitui um desafio importante para a nossa compreensão dos mecanismos pelos quais estas enzimas executam as suas funções biológicas (47)

Tabela 7 – Metiltransferases: substratos alternativos de proteínas não-histonas

Metiltransferase	Substrato	
	Histona	Não-histona
G9a/EHMT2	H3K9me2	p53, G9a, C/EBPb, Reptin, RARa, DNMT1,
NSD1	H3K36me2	NFkB
SMYD2	H3K36me2	p53, RB
SMYD3	H3K4me2/me3 H4K20me3 H4K5	VEGFR
SET8	H4K20me1	p53
SET7/9	H3K4me1	p53, TAF7, TAF10, ERa, AR, DNMT1, NFkB, PCAF, RB, E2F1, STAT3, Tat

Adaptado de Zhang, 2012 (63)

### 1.1.9 A Família *SETD*

O domínio SET é um domínio protéico inicialmente descrito com parte de um região conservada da proteína *Drosophila Trithorax* e posteriormente identificada também na *Drosophila Su(var)3-9* e nas proteínas do “Enhancer of zeste”. Zeste é o nome dado a um ativador de transcrição do DNA estudado inicialmente em *Drosophila* que pode ser potencializado por um grupo de proteínas denominadas “Enhancer of zeste”. O acrônimo SET é derivada das iniciais destas proteínas (74).

O domínio SET tem como característica principal a sua capacidade de adicionar grupos metil a seus substratos. Um dos principais sítios de ação do domínio SET é a lisina 4 da histona 3 (75).

A família de genes *SETD* codifica as proteínas com domínio SET, sendo composta por 10 genes: *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR*. Suas localizações, atividades enzimáticas e provável papel na carcinogênese estão resumidas na tabela 8.

O gene *SETD1A* está localizado no braço curto do cromossomo 16 no locus

11.2 (16p11.2). Ele faz parte do complexo de metiltransferase de histona promovendo mono, di ou trimetilação da lisina 4 da histona 3 (76). O papel carcinogênico envolvendo o gene *SETD1A* foi estudado num modelo de camundongos, demonstrando que o silenciamento deste gene pode resultar em desaparecimento da lesão tumoral de células de câncer colo-retal inoculadas nos animais (77).

Tabela 8 – Localização, ação enzimática e provável papel na carcinogênese da família *SETD*.

Gene	Localização Genômica	Ação Enzimática	Provável papel na carcinogênese
<i>SETD1A</i>	16p11.2	H3K4me1,2,3	Oncogene
<i>SETD1B</i>	12q24.31	H3K4me3	Desconhecido
<i>SETD2</i>	3p21.31	H3K36me1	Gene Supressor Tumoral
<i>SETD3</i>	14q32.2	H3K36me1	Oncogene
<i>SETD4</i>	21q22.13	Desconhecida	Possível oncogene
<i>SETD5</i>	3p25.3	Desconhecida	Desconhecido
<i>SETD6</i>	16q21	H2AZKme1	Desconhecido
<i>SETD7</i>	4q28	H3K4me1	Gene Supressor Tumoral
<i>SETD8</i>	12q24.31	H4K20me1	Oncogene
<i>SETMAR</i>	3p26.1	H3K4me1	Oncogene

Além disso, Simpson e colaboradores demonstraram que o tratamento de células de câncer de mama com inibidor de glutamina, denominado componente 968, mostrou-se citotóxico para células de câncer de mama. O mecanismo da citotoxicidade deste componente se deveu a hiporregulação de 20 genes. Esta hiporregulação, por sua vez, se deveu aos baixos níveis metilação da lisina 4 da histona 3 nos loci destes genes decorrente da hipoexpressão do gene *SETD1A* (78). O *SETD1A* parece, então, comportar-se como um oncogene.

O gene *SETD1B* está localizado no braço longo do cromossomo 12 no locus 24.31 (12q24.31). Ele é um componente do complexo metiltransferase de histona e promove trimetilação da lisina 4 da histona 3 (79). O seu papel na carcinogênese humana não é ainda completamente conhecido. Em pacientes com câncer de estômago e câncer de cólon, existe um forte correlação entre a presença de instabilidade de microssatélites e mutações do tipo *frameshift* no éxon 1 deste gene(80). Associado a este achado, Song e colaboradores demonstraram que em câncer de esôfago este gene está mutado com uma frequência relativamente

alta(81). Camundongos com deficiência na proteína de manutenção do minicromossomo ( Mcm2) apresentam uma alta taxa de linfoma linfobástico tímico. É sabido que a deficiência desta proteína leva ao aparecimento de cânceres e de deficiência em células tronco através de deleções em alguns genes. Um dos genes alvo de deleção é o gene *SETD1B*(82).

O gene *SETD2* está localizado no braço curto do cromossomo 3 no locus 21.31 (3p21.31). A proteína derivada do gene é uma metiltransferase de histona que metila a lisina 36 da histona 3. Esta metilação está associada com ativação da cromatina (83). Além disso, esta proteína contém um domínio de ativação transcricional que tem sido achado em associação com a hiperfosforilação da RNA polimerase II (84) . O *SETD2* tem sido relatado como um gene supressor tumoral. Mutações deste gene têm sido associadas ao desenvolvimento de câncer renal (85-87) . Em câncer de mama, dados relativamente recentes têm demonstrado uma expressão maior do *SETD2* no tecido normal quando comparado ao tecido tumoral em amostras de pacientes tratadas de câncer de mama. Desta maneira, o conceito de gene supressor tumoral tem ganhado cada vez mais aceitação (88-90) .

O gene *SETD3* está localizado no braço longo do cromossomo 14 no locus 32.2 (14q32.2). Tem como atividade enzimática a metilação da lisina 36 da histona 3. A hiperexpressão do *SETD3* diminui a viabilidade e ativa a via caspase-3, indicando uma possível ação na morte celular por apoptose e regulação do ciclo celular (91). Sua relação com a carcinogênese foi estudada por Chen e colaboradores. Há um superexpressão de RNA mensageiro (mRNA) truncado com perda do domínio SETD3 em linfomas, indicando sua possível ação como gene supressor tumoral (92). Não há estudos do *SETD3* em câncer de mama.

O gene *SETD4* está localizado no braço longo do cromossomo 21 no locus 22.13 (21q22.13) (93, 94). A sua atividade enzimática ainda não foi estabelecida. Arantes e colaboradores demonstraram uma hiperexpressão deste gene em amostras de câncer de mama triplo negativo, assim como o papel da sua superexpressão em linhagem celular de câncer de mama (95).

O gene *SETD5* está localizado no braço curto do cromossomo 3 no locus 25.3 (3p25.3) (94, 96). A sua atividade enzimática ainda não foi estabelecida, e não há na literatura nenhum relato sobre o papel deste gene, assim como seu papel na carcinogênese humana.

O gene *SETD6* está localizado no braço longo do cromossomo 16 no locus 21 (16q21) (94). Tem como atividade enzimática a monometilação da lisina 7 na histona 2A variante AZ (H2AZ) (97). A depleção do gene *SETD6* levou células tronco embrionárias de camundongos a diferenciarem-se. Especula-se, por este achado, que este gene está envolvido na diferenciação celular. (97). Seu papel na carcinogênese humana ainda não está estabelecido.

O gene *SETD7* está localizado no braço longo do cromossomo 4 no locus 28 (4q28). Tem como atividade enzimática principal a monometilação da lisina 4 da histona 3. Além disso, tem capacidade de promover metilação em outros substratos não-histonas (98, 99). Em cultura de células tratadas com berberine (40-160 µmol/L), o *knockdown* do *SETD7* com RNA de interferência (siRNA) aumentou de forma significativa os níveis da proteína NF-κB, além da recuperação parcial da proliferação celular (100). A metilação do MYPT1, um substrato não-histona do *SETD7*, leva a níveis reduzidos de proteína RB1 fosforilada em células tumorais, demonstrando seu papel com regulador do ciclo celular, diminuindo a taxa de proliferação celular (101). O receptor de estrógeno é diretamente metilado na lisina 302 pela metiltransferase *SETD7*. Com isso, há estabilização do receptor do estrógeno, propiciando que os genes alvos do RE sejam transativados, revelando, desta maneira, um interessante papel do *SETD7* na carcinogênese do câncer de mama (102)

O gene *SETD8* está localizado no braço longo do cromossomo 12 no locus 24.31 (12q24.31). Tem como atividade enzimática a monometilação da lisina 20 na histona 4. Tem um papel ainda não totalmente esclarecido no controle da progressão do ciclo celular (103). Yu e colaboradores demonstraram que o microRNA-7 inibe a monometilação da lisina 20 da histona 4. Desta maneira há uma supressão da transição epitélio-mesênquima das células tumorais de câncer de mama diminuindo seu potencial invasivo (104). Além disso, vários autores têm descrito que o polimorfismo do sítio de ligação denominado miR-502 de uma região 3' não traduzida do *SETD8* denominada rs 16917496 está associada com a idade mais precoce de aparecimento de câncer de mama (105, 106), risco de aparecimento de câncer epitelial de ovário (107) e desfecho clínico desfavorável em câncer de fígado do tipo hepatocarcinoma (108).

O gene *SETMAR* está localizado no braço curto do cromossomo 3 no locus 26.1 (3p26.1). Este gene codifica uma proteína de fusão que contém um domínio N-

terminal metil transferase e um domínio transposase C-terminal. Em relação ao seu domínio metiltransferase, ele metila a lisina 4 da histona 3 (109-112). As cromátides irmãs necessitam ser desenroladas durante a mitose num processo denominado decatenação. A enzima responsável por este processo é denominada topo II alpha. Caso não sejam desenroladas, elas ficam presas no fuso mitótico. Em células de leucemia mieloide aguda, a ação do *SETMAR* tem sido associada à perda do *decatenation checkpoint* em células tratadas com inibidores da topo II alpha. Com isso, mesmo células com alterações nos fusos mitóticos, e que podem gerar células com fusões gênicas anômalas, deleções, entre outras, seguem no ciclo celular (113). Em células tumorais de câncer de mama, o silenciamento da METNASE levou à recuperação da sensibilidade da célula tumoral do câncer de mama a uma medicação quimioterápica denominada antraciclina, cujo principal alvo é a topo II alpha (114).

Pelo fato de ser uma família recentemente descrita na literatura científica, com poucas informações relacionadas ao seu provável papel na carcinogênese mamária, e devido as evidências de alterações em outros cenários tumorais, realizamos a avaliação da expressão de genes da família *SETD* em câncer de mama, fazendo uma associação desta expressão com fatores clínicos relevantes.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a expressão dos genes da família *SETD* entre as amostras de células normais e células tumorais de pacientes portadoras de câncer de mama .

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Identificar os genes hiperexpressos e hipoexpressos nas amostras de tecidos normais e tumorais de pacientes com câncer de mama;
- . Associar os achados clínicos, anatomo-patológicos de importância prognóstica em câncer de mama com os achados de expressão dos genes da família *SETD* nas amostras normais e tumorais de pacientes com câncer de mama;
- . Avaliar a expressão protéica dos genes com expressão aumentada nas amostras normais e tumorais de pacientes com câncer de mama.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS NORMAL E TUMORAL

Pacientes diagnosticadas com câncer de mama com indicação de tratamento cirúrgico, atendidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), foram convidadas a participar deste estudo. No momento da cirurgia, fragmentos tumorais (e, quando possível, fragmentos não-tumorais) foram coletados por profissional médico qualificado. O tratamento cirúrgico, assim como a abordagem dos linfonodos axilares, seguiu a estratégia da equipe assistente da paciente.

Cada fragmento (normal e tumoral) foi sinalizado por uma marcação com tinta de caneta nanquim e dividido longitudinalmente em duas partes que formavam uma imagem em espelho uma da outra: uma parte foi imediatamente condicionada em um criotubo e congelada em nitrogênio líquido ( $N_2L$ ) enquanto a outra parte foi condicionada em uma solução de formaldeído e encaminhada para análise patológica no HUB. Após análise patológica da imagem em espelho, o laudo histopatológico tinha a seguinte padronização: “amostra com 100% de tumor OU amostra com X% de tumor a partir da extremidade do nanquim. As amostras tumorais que apresentaram pelo menos 70% de malignidade de forma contínua na amostra foram usadas neste trabalho. Mesmo nas amostras que não apresentavam 100% de lesão tumoral, selecionamos apenas a parte tumoral do fragmento, com corte da amostra na sua metade tumoral orientada pela tinta nanquim. A análise patológica para determinação da porcentagem de malignidade nas amostras coletadas foi realizada por microscopia óptica em cortes representativos da amostra (figura 5).

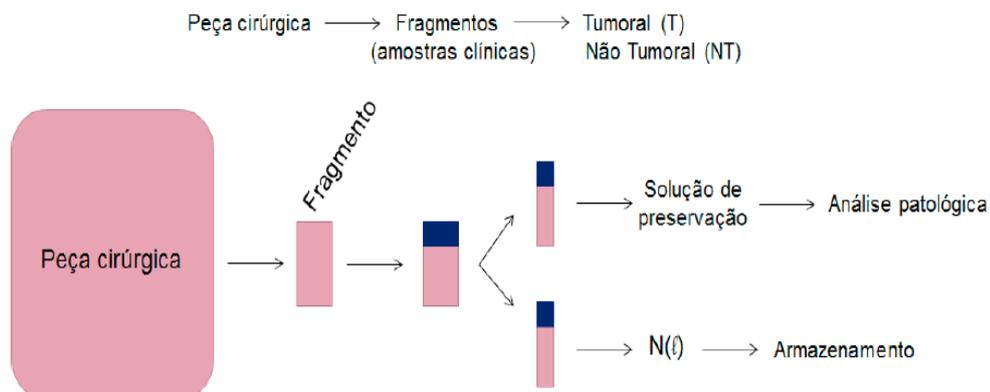


Figura 5 Esquema mostrando a captação dos fragmentos de amostras clínicas. Os fragmentos eram coletados no momento da cirurgia, imediatamente após a retirada da peça cirúrgica propriamente dita. Em azul, representação da marcação com tinta nanquim, a fim de nortear o fragmento. Quando possível, também era coletado da mesma peça cirúrgica, fragmento de tecido normal.

### 3.2 EXTRAÇÃO DO RNA

As amostras armazenadas em nitrogênio líquido selecionadas para o estudo foram retiradas rapidamente dos criotubos e postas em um novo microtubo de 1,5ml livre de ribonucleases (RNAses). O fragmento foi macerado mecanicamente utilizando o ULTRA-TURRAX modelo T10B. É importante ressaltar que tais instrumentais foram previamente tratados com água DPEC (Serva) e com RNase ZAP (Sigma). Após a maceração, acrescentou-se 1mL de TRIzol® (Invitrogen) em cada tubo, homogeneizando a amostra e centrifugando-a a 15000rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a camada de gordura no sobrenadante foi removida e o restante do sobrenadante foi transferido para um novo tubo livre de RNAses; o material precipitado foi descartado. O tubo permaneceu em temperatura ambiente por cinco minutos para dissociação do complexo nucleoprotéico e, dado o tempo, adicionou-se 200µL de clorofórmio, agitando o tubo vigorosamente por 15 segundos, deixando-o em temperatura ambiente por três minutos. O tubo foi então centrifugado durante 20 minutos a 15000rpm a 4°C. Para isolar o RNA total, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo livre de RNAses, adicionando-se em seguida 500µL de isopropanol. O tubo foi invertido de três a cinco vezes para homogeneizar e mantido em temperatura ambiente por dez minutos. Para precipitar o RNA total, o

tubo foi centrifugado por 15000rpm durante 12 minutos a 4°C; caso o precipitado fosse muito pequeno ou invisível, acrescentou-se 1µL de glicogênio livre de RNAses (Sigma) e a centrifugação foi feita novamente. Após a precipitação, o isopropanol foi descartado e acrescentou-se 1mL de etanol 75% gelado livre de RNAses. O tubo foi agitado vigorosamente pelo por cerca de 10 segundos e centrifugado a 15000rpm durante 7 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o etanol e a lavagem com etanol gelado foi repetida mais duas vezes. Após a última lavagem, o etanol 75% foi descartado e os tubos com o RNA precipitado foram secos em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Foram adicionados de 10 a 50µL de água MiliQ, dependendo do tamanho do precipitado, e o tubo foi posto em termobloco a 65°C durante 10 minutos. Dado o tempo, o material foi ressuscitado e a quantificação e pureza foram medidas usando o espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Guardou-se 1µL de cada amostra que obtivesse quantificação superior a 1µg/µL e volume suficiente para esta concentração das amostras que obtivessem valores inferiores. Após a extração do RNA total, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do material e depois tratadas com desoxirribonuclease I (DNase I; Sigma).

Em seguida, o cDNA foi sintetizado com 2µg do RNA extraído utilizando o kit de transcrição reversa de cDNA *The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. Após a síntese do cDNA, este foi testado por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) usando iniciadores para o gene da β-actina (Integrated DNA Technologies; sequência forward 5´GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3´ reversa 5´AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3´) seguindo a seguinte ciclagem: 94°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos (28 ciclos) e 72°C por 1 minuto. O produto da PCR foi submetido à eletroforese e a qualidade do material extraído foi confirmada com a amplificação das bandas.

### 3.3 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

O desenho e a construção dos iniciadores e das sondas para os genes da família *SETD* e para o gene constitutivo β-actina foram feitos por meio do serviço *Assay by Design* fornecido pelo fabricante para ensaios com o sistema Taqman®

(Applied Biosystems). Assim que adquiridos, os ensaios para  $\beta$ -actina (ID Hs99999903\_m1) e para os genes da família SETD (*SETD1A* Hs00322315\_m1, *SETD1B* Hs00902716\_m1, *SETD2* Hs01014784\_m1, *SETD3* Hs01119427\_m1, *SETD4* Hs00213731\_m1, *SETD5* Hs00216962\_m1, *SETD6* Hs00227507\_m1, *SETD7* Hs00363902\_m1, *SETD8* Hs00360662\_s1, *SETD9* Hs00538177\_m1) foram padronizados por diluição seriada utilizando cDNA da linhagem HCC1954.

Depois de determinar a linha de *threshold* ideal de cada ensaio, foi dada continuidade ao PCR em tempo real. Para uma reação, utilizou-se 2,5 $\mu$ L de água MiliQ, 5 $\mu$ L de MasterMix Universal para Taqman® (Applied Biosystems), 0,5 $\mu$ L do ensaio de iniciadores e sonda (Applied Biosystems) e 2 $\mu$ L de amostra ( que apresentavam vários padrões diferentes de diluição), totalizando 10 $\mu$ L de volume final. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) em triplicata para cada gene e os ciclos foram determinados automaticamente pelo programa do StepOnePlus™ (Applied Biosystems; Holding stage: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C; 1 minuto a 60°C).

### 3.4 ANÁLISES DOS DADOS DE PCR EM TEMPO REAL

Os dados gerados pelo equipamento foram organizados em uma tabela utilizando o programa Excel (Microsoft) e todos os cálculos para chegar na quantificação relativa pelo método  $\Delta\Delta CT$  foram baseados no manual do fabricante do equipamento (Applied Biosystems) (115). A média dos valores de todo *Cycle threshold* (CT) dos genes da família *SETD* de cada amostra foi calculada e normalizada por subtração do valor de CT do gene endógeno ( $\beta$ -Actina) co-amplificado, gerando o valor  $\Delta CT$  ( CT gene em estudo – CT gene endógeno). Em seguida, foi calculada a média dos CT de todas as amostras não-tumorais e a média dos CT do gene endógeno destas mesmas amostras, com cálculo do  $\Delta CT$  das médias. O  $\Delta CT$  médio das amostras tumorais foi subtraído do  $\Delta CT$  médio das amostras não tumorais, gerando o valor  $\Delta\Delta CT$ . A quantidade do gene-alvo, normalizada com uma referência endógena e relativa ao calibrador foi convertida em quantificação relativa (QR) pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Utilizando o valor de QR final, os gráficos foram gerados em GraphPad Prism versão 5 e a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 21. Utilizamos os testes de

amostras independentes de *Mann-Whitney*, o teste de correlação binária de *Spearman* e o método dos mínimos quadrados para regressão linear.

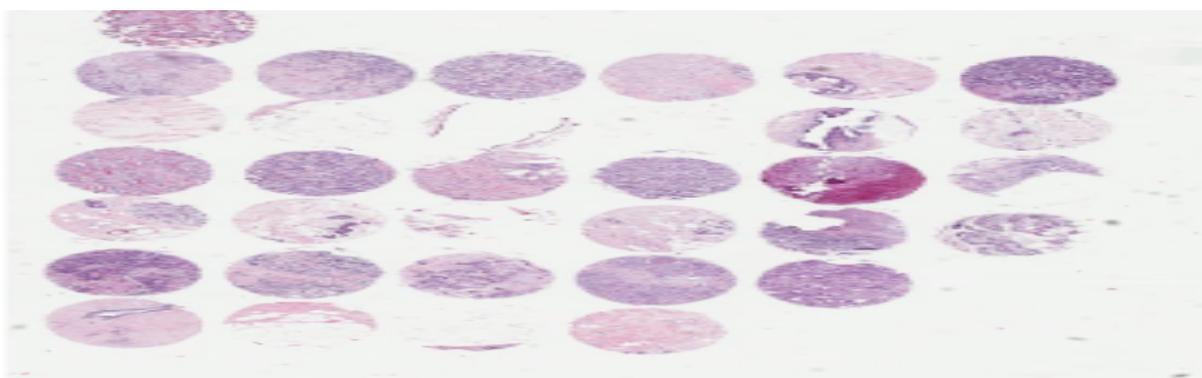
### 3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foi confeccionado um bloco de microarranjo de tecidos ( MAT)(116) com amostras de 17 pacientes em duplicata com câncer de mama ( tabela 9 ). Estas amostras eram provenientes de pacientes participantes do estudo e foram extraídas do bloco de parafina utilizado na análise do diagnóstico histopatológico realizado após o tratamento cirúrgico definitivo da paciente. Utilizamos como controle negativo a margem normal dos tumores em análise através de microdissecção. Além das lâminas de MAT, utilizamos lâminas provenientes da avaliação histopatológica do laudo histopatológico habitual para avaliação do carcinoma ductal *in situ*.. Os cortes de tecido foram avaliados por dois patologistas independentes. Houve confirmação de carcinoma ductal invasivo com contra-parte normal na lâmina MAT. Seções de amostras de câncer de mama humano foram submetidas à coloração de imuno-histoquímica por polímeros utilizando o kit comercial NOVOLINK (Novocastra). Resumidamente, a atividade da peroxidase endógena das amostras desparafinizadas e desidratadas foi inibida por tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3%. A ligação não específica foi bloqueada através da incubação de secções com a solução PROTEIN BLOCK (Novocastra) em câmara humidificada, durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido por incubação por 4 horas com os anticorpos primários, a saber: anticorpo anti-SETD1B 1:500 (abcam ab113964), Anti-SETD5 1:100 (Santa Cruz Biotechnology SC-103209), anti-SETD8 1:500 (abcam ab3798) e anti-SETMAR 1:500 (abcam ab129455). As secções foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com a solução POST PRIMARY (Novocastra) durante 30 minutos à temperatura ambiente, e, em seguida, incubadas com o polímero do kit NOVOLINK (Novocastra) durante 30 minutos. Imunomarcação específica foi revelada pela solução DAB CHROMOGEN (Novocastra). As lâminas foram desidratadas com álcool graduado seguido por lavagem com xileno e montados em lâminas. Hematoxilina foi usada para contrastação nuclear.. Foi realizada uma avaliação com *score* de histoquímica variando de 0 a 300 para núcleo e citoplasma através do sistema H-score para imuno-histoquímica.

### 3.6 PESQUISA *IN SILICO*

Para análise comparativa, fizemos uma pesquisa em base de dados do *THE HUMAN PROTEIN ATLAS* e do *cBio Portal* ( *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*). Os dados provenientes destas base de dados foram comparados com nossos resultados.

Tabela 9 - Distribuição das amostras na lâmina MAT



Placenta					
CDI EC IIB	CDI EC IIB	CDI EC IIA	CDI EC IIIC	CDI EC IIIA	CA Metaplásico EC IIIA
CDI EC IIB	CDI EC IIB	CDI EC IIA	CDI EC IIIC	CDI EC IIIA	CA Metaplásico EC IIIA
CDI EC IIB	CDI EC IIB	CDI EC IIIC	CDI EC IIIA	CDI EC IIIC	CDI EC IIIC
CDI EC IIB	CDI EC IIB	CDI EC IIIC	CDI EC IIIA	CDI EC IIIC	CDI EC IIIC
CDI EC IIIC	CDI EC IIA	CDI EC IIA	CDI EC IIA	CDI EC IIB	
CDI EC IIIC	CDI EC IIA	CDI EC IIA	CDI EC IIA		

Legenda : amarelo= tumor , azul = margem normal do tumor. CDI – Carcinoma Ductal Invasivo. EC – estadio Clínico-patológico

### 3.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), baseado na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, protocolado sob o número 025/09 .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICA CLÍNICO-PATOLÓGICA DAS PACIENTES

Realizamos a coleta de 52 amostras de tecido normal e tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de câncer de mama. Todas as pacientes eram do gênero feminino. Houve possibilidade de análise completa nas amostras provenientes de 24 pacientes, com total de 31 amostras, sendo 18 amostras tumorais e 13 normais e sendo ainda 07 amostras pareadas (quando a amostra normal e tumoral é da mesma paciente).

Houve impossibilidade de análise completa de 28 amostras. Os principais motivos da impossibilidade de análise foram ausência de orientação espacial pelo nanquim na amostra (n=4), pureza inadequada do material após análise do espectrofotômetro(n=12), quantificação insuficiente de RNA no espectrofotômetro (n=9) e ausência de RNA íntegro (n=3).

A idade média das pacientes foi de 54,1 anos, sendo que a paciente mais nova apresentava a idade de 26 anos e a mais idosa com 89 anos (Tabela 10).

Registrou-se 11 pacientes com tumor na mama direita, 10 pacientes com tumor na mama esquerda e 3 pacientes com tumor bilateral. A maioria das pacientes foi diagnosticada com doença localmente avançada (Tabela 10).

Tabela 10 - Idade, lateralidade e estadiamento do câncer de mama das pacientes

Paciente	Idade	Lateralidade 1 - direita 2- esquerda	Estadiamento TNM
43	26	2	IIB
42	29	1	0
14	33	1	IIA
28	36	1	IIIC
23	43	1	IIB
16	44	2	IIB
48	49	2	IIB
38	51	1	IIB
49	52	2	IIB
35	53	2	IIIA
20	54	1	IIIC
24	56	2	IIIA
33	58	2	IIA
17	59	2	IIIA
40	59	1	IIIC
47	59	1 e 2*	IIIC
3	60	1	IIIC
32	60	1 e 2*	IIIA
4	61	1 e 2*	IIA
19	62	1	IIIC
44	63	1	ND
22	64	2	IIIA
45	79	1	IA
25	89	2	IIB

\* Amostra utilizada na análise molecular; ND não disponível

A maioria das pacientes apresentava carcinoma ductal infiltrante sem nenhuma classificação adicional, sendo que duas pacientes apresentavam tumores metaplásicos de mama . A maioria das pacientes não apresentava carcinoma ductal *in situ* associado ao componente invasivo tumoral.( Tabela 11).

**Tabela 11 - Características das biópsias das pacientes com câncer de mama**

Amostra	Tipo	Tumor	Tamanho - cm	Grau	CDIS	Multf.	Multc.	
43	N	CDI	SOE	3,6	4	NAO	NAO	NÃO
48	T	CDI	SOE	2,8	5	SIM	NAO	NÃO
38	T	CDI	SOE	2,3	6	NÃO	NÃO	SIM
4	T	CLI	SOE	3	6	NÃO	NÃO	NÃO
19	T	CDI	SOE	2	6	SIM	NÃO	NÃO
45	T	CDI	SOE	2	6	NAO	NAO	NAO
3	T	CDI	SOE	4	7	NÃO	NÃO	NÃO
23	T	CDI	SOE	2,8	8	SIM	SIM	SIM
25	T	CD1	SOE	4,5	8	SIM	NÃO	NÃO
16	T	Outros	Metap.	9	9	NÃO	NÃO	NÃO
35	T	Outros	Metap.	6,5	9	NÃO	NÃO	NÃO
33	T	CDI	SOE	4	9	NÃO	NÃO	NÃO
47	T	CDI	SOE	10	9	NAO	NAO	NAO
42	N	CDI	SOE	0	QT Neo	NÃO	NÃO	NÃO
14	T	CDI	SOE	3,5	QT Neo	SIM	SIM	NÃO
28	T	CDI	SOE	1,1	QT Neo	NÃO	SIM	NÃO
49	T	CDI	SOE	4	QT Neo	NAO	NAO	NAO
20	T	CDI	SOE	5,5	QT Neo	NÃO	SIM	SIM
24	T	CDI	SOE	5	QT Neo	NÃO	NÃO	NÃO
17	T	CDI	SOE	5	QT Neo	NÃO	NÃO	NÃO
40	T	CDI	SOE	1,5	QT Neo	NÃO	SIM	SIM
32	N	CDI	Microp.	0,38	QT Neo	SIM	SIM	NÃO
22	N	CDI	SOE	8	QT Neo	NÃO	NÃO	NÃO

Legendas: CDIS-Carcinoma Ductal *in situ*; Multf.- Multifocalidade; Multc.-Multicentricidade; N-normal; T-Tumoral; CDI-Carcinoma Ductal Infiltrante; CLI-Carcinoma Lobular Infiltrante; SOE-sem orientação específica; Metap.-metaplásico; QTneo-Quimioterapia Neoadjuvante; Micropap.-Micropapilar

O grau tumoral, que é um parâmetro histológico de proliferação celular foi avaliado em 13 pacientes com modas 6 e 9 , variando de 4 a 9. Em 43 % de pacientes não foi possível a realização da avaliação do grau devido ao tratamento quimioterápico neoadjuvante (Tabela 11).

Em 7 pacientes foi encontrada presença de multicentricidade ou multilocalidade na apresentação tumoral. (Tabela 11).

O tamanho médio do tumor foi de 3,9 cm, variando de 0 ( resposta completa após tratamento neoadjuvante ) até 10 cm conforme mostra a figura 6.

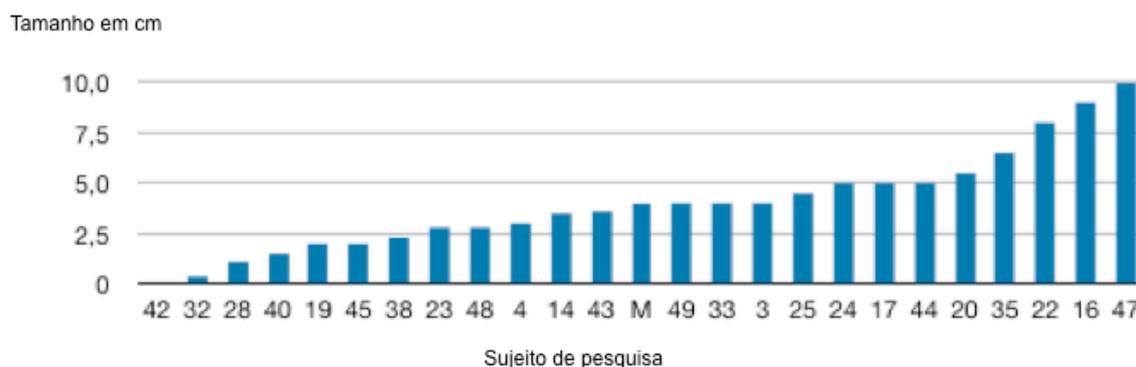


Figura - Tamanho das amostras tumorais

Figure 6 - Tamanho das amostras tumorais

A maioria das pacientes apresentava presença de invasão angiolinfática, sendo que 6 apresentavam invasão angiolinfática e invasão perineural. A maioria das pacientes não apresentava necrose tumoral e não apresentava infiltrado inflamatório tumoral ( Tabela 11).

Table 12 - Avaliação da invasão angiolinfática e perineural e necrose tumoral

Amostra	Invasão Angiolinfática	Invasão Perineural	Infiltrado Inflamatório	Necrose tumoral
43	SIM	SIM	SIM INTENSO	NÃO
48	SIM	SIM	NAO	SIM
38	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
4	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
19	SIM	NÃO	LEVE	SIM
45	NAO	NAO	NAO	NAO
3	SIM	NÃO	LEVE	NÃO
23	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
25	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
16	SIM	NÃO	NÃO	SIM
35	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
33	NÃO	NÃO	INTENSO	SIM
47	SIM	SIM	NAO	SIM
42	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
14	NÃO	NÃO	MODERADO	NÃO

28	SIM	SIM	NÃO	NÃO
49	NAO	SIM	NAO	NAO
20	SIM	SIM	NÃO	NÃO
24	SIM	NÃO	NÃO	SIM
17	NÃO	NÃO	INTENSO	NÃO
40	SIM	SIM	NÃO	NÃO
32	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
22	SIM	NÃO	NÃO	SIM

Houve uma média de 18 linfonodos isolados após o esvaziamento axilar, com mínimo de 1 e máximo de 36 linfonodos avaliados. A média de linfonodos com lesão metastática foi 5,8.

Quando avaliamos apenas as pacientes que apresentavam invasão angiolinfática e também invasão perineural, verificamos que há uma média de 8,7 linfonodos acometidos contra apenas 1,3 linfonodos no grupo que não apresentam nenhuma das duas características (Tabela 12).

**Tabela 13 - Relação entre número de linfonodos acometidos e invasão angiolinfática e perineural**

Número da Amostra	Invasão Angio-Linfática	Invasão Perineural	Linfonodos Isolados	Linfonodos Acometidos
45	NÃO	NAO	22	0
38	NÃO	NÃO	20	1
23	NÃO	NÃO	27	2
25	NÃO	NÃO	20	2
35	NÃO	NÃO	17	3
33	NÃO	NÃO	34	0
42	NÃO	NÃO	15	0
14	NÃO	NÃO	9	0
17	NÃO	NÃO	13	4
19	SIM	NÃO	36	31
3	SIM	NÃO	36	15
16	SIM	NÃO	17	0
24	SIM	NÃO	19	2
32	SIM	NÃO	21	8
22	SIM	NÃO	18	3
49	NÃO	SIM	25	3
4	NÃO	SIM	3	0

43	SIM	SIM	10	2
48	SIM	SIM	1	1
47	SIM	SIM	11	11
28	SIM	SIM	16	15
20	SIM	SIM	18	18
40	SIM	SIM	13	13

Levando-se em consideração a porcentagem de linfonodos acometidos, há uma diferença significativa da porcentagem de linfonodos acometidos em relação aos retirados quando há presença de invasão angiolinfática como demonstrado no figura 7.

### Invasão Angio-linfática e Porcentagem de Linfonodos Positivos

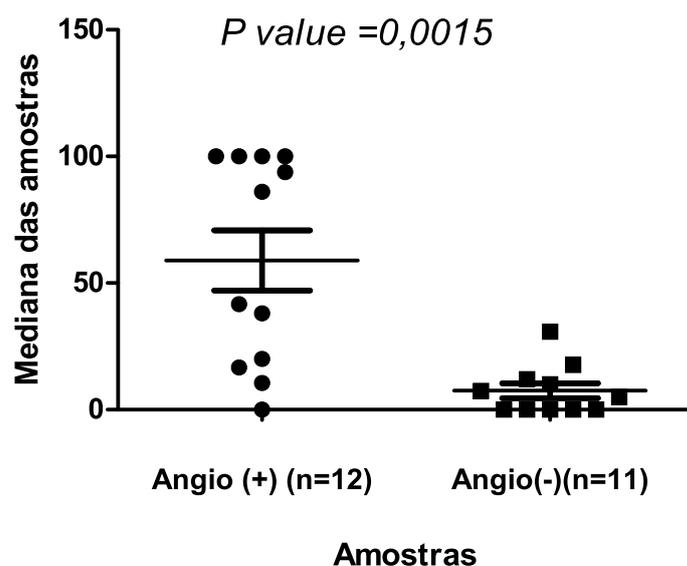


Figura 7- Relação entre invasão angiolinfática e porcentagem de linfonodos acometidos: a porcentagem de linfonodos acometidos/linfonodos retirados é maior quando há presença de invasão angiolinfática. Teste de *Mann-Whitney*

Quanto ao subtipo molecular, houve possibilidade de análise de 18 pacientes, sendo que 07 pacientes apresentaram-se com subtipo triplo negativo, como demonstrado na tabela 14.

Tabela 14 – Perfil imuno-histoquímico das amostras tumorais

Sujeito de Pesquisa	RE	RP	CERB-B2	KI 67
3T2	Negativo	Negativo	Negativo	ND
24T	Negativo	Negativo	Negativo	ND
25T1	Negativo	Negativo	Negativo	5
33T2	Negativo	Negativo	Negativo	10
35T2	Negativo	Negativo	Negativo	95
45T2	Negativo	Negativo	Negativo	10
47T2	Negativo	Negativo	Negativo	40
23T	ND	ND	ND	ND
19T	Positivo	Positivo	Negativo	ND
20T	ND	ND	ND	ND
4T	Positivo	Positivo	Negativo	50
49T1	Positivo	Positivo	Negativo	20
48T1	Positivo	Positivo	Negativo	30
14T	Positivo	Positivo	ND	ND
17T	ND	ND	ND	ND
28T	Positivo	ND	Negativo	ND
38T2	Positivo	Negativo	Negativo	ND
40T	ND	ND	ND	ND

RE – receptor de estrôgenos, RP – receptor de progesterone, ND- não disponível

No total, 10 pacientes foram submetidas a quimioterapia neoadjuvante, sendo que apenas 1 apresentou resposta patológica completa.

## 4.2 ESTUDOS DE EXPRESSÃO RELATIVA

### 4.2.1 Expressão Relativa dos Genes da Família *SETD* nas Amostras de Tecidos Tumorais de Câncer de Mama quando Comparados às Amostras dos Tecidos Normais

Para investigar a expressão de todos os genes da família *SETD* em amostras de tecido mamário normal e tumoral, fez-se uma análise da quantificação relativa nas 18 amostras tumorais e nas 13 amostras de tecidos normais. Após a verificação da expressão relativa, aplicou-se o teste estatístico de amostras não-pareadas de *Mann-Whitney*. Constatou-se que, de todos os genes avaliados, o gene *SETMAR* está em média aproximadamente 3 vezes mais expresso nas amostras tumorais de câncer de mama quando comparados com as amostras de tecido normais de mama das pacientes portadoras de câncer de mama ( Figura 8 ).

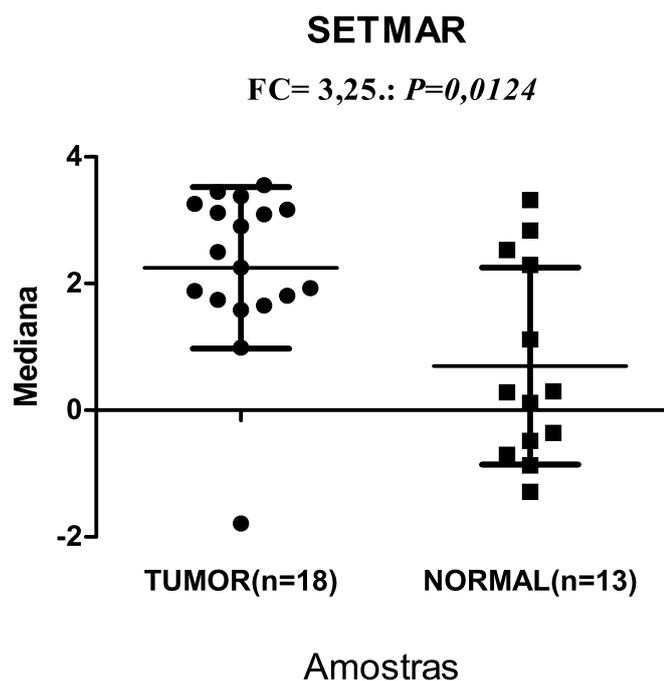
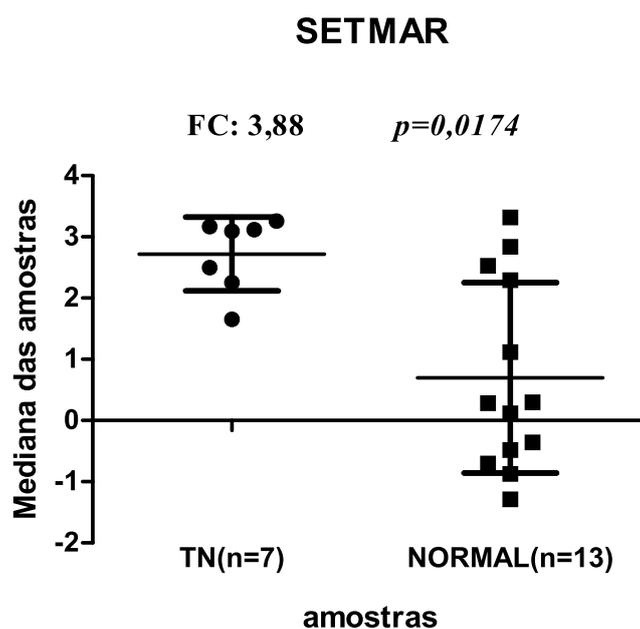


Figura 8 Expressão relativa do *SETMAR* entre tecido tumoral e normal. FC= *Fold Change*. Teste de *Mann-Whitney*

#### 4.2.2 Expressão Relativa da Família *SETD* em Amostras Teciduais Tumorais do Sub-tipo Triplo Negativo

Quando separamos as amostras de pacientes cujo laudo imuno-histoquímico apontava para tumor do subtipo triplo negativo ( N=7 ) e comparamos com o pool de amostras de tecidos normais (N=13), notamos que havia uma expressão relativa aumentada do gene *SETMAR* (figura 9) nas amostras tumorais (teste estatístico de amostras não-pareadas U de *Mann-Whitney*). Na análise desta característica clínica, nenhum outro gene da família *SETD* se mostrou significativamente alterado dentro da coorte examinada.



**Figure 9-** Expressão comparativa do *SETMAR* entre tecido tumoral triplo negativo e normal. TN = triplo negativo. FC= *Fold Change*. Teste de *Mann-Whitney*

#### 4.2.3 Expressão dos Genes da Família *SETD* em Tumores que Apresentam Invasão Angiolinfática

Realizamos a avaliação da expressão comparativa das 18 amostras tumorais correlacionando esta expressão com a presença de invasão angiolinfática. Como demonstrando anteriormente, existe uma correlação direta entre invasão angiolinfática e porcentagem de linfonodos axilares acometidos em câncer de mama, sendo este um fator prognóstico importante em câncer de mama. O gene *SETD8* encontrava-se com hiperexpressão relativa acima de 10 vezes quando da presença da invasão angiolinfática (N=8) comparada a ausência deste achado anatomopatológico (N=10) ( Figura 10). Nenhum dos outros genes da família *SETD* mostrou alteração em relação a esta característica clínica.

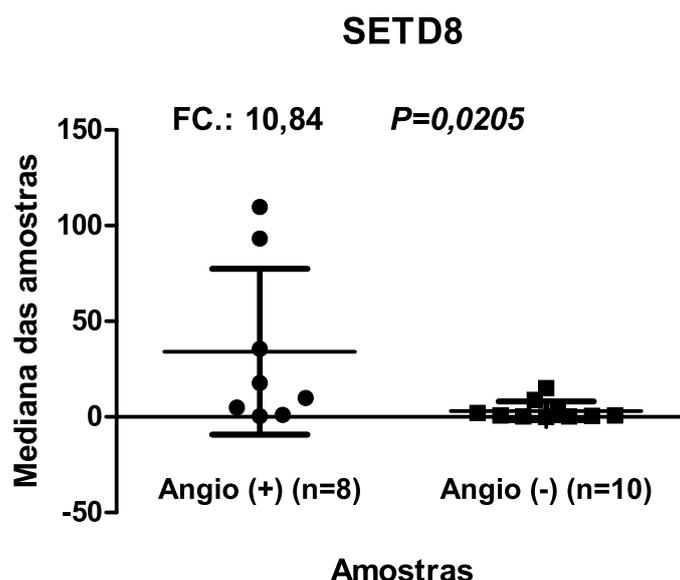


Figure 10 - Expressão relativa do *SETD8* e invasão angiolímfática. Angio(+)/(-) =presença/ausência de invasão angiolímfática. FC= *Fold Change*. Teste de *Mann-Whitney*

#### 4.2.4 Relação da Expressão dos genes *SETD5* e *SETD8* e Número de Linfonodos Acometidos e Estadiamento

Quando avaliamos a expressão relativa dos genes da família *SETD* em pacientes com forte carga tumoral axilar definidas como a presença de no mínimo 10 linfonodos axilares comprometidos (n=6), identificamos um expressão relativa aumentada dos genes *SETD5* e *SETD8* quando comparadas às pacientes com axila negativa ou menos de 10 linfonodos positivos na axila (n=12) (Figuras 11 e 12).

Os demais genes da família *SETD* não se mostraram alterados em relação a esta característica clínica.

Quando realizamos a avaliação por estadiamento, o gene *SETD8* apresentava-se com expressão relativa aumentada em estádios avançados (>IIB) quando comparada a estádios menos avançados, com uma tendência a expressão relativa também aumentada em tumores avanç do gene *SETD5*. ( figura 13).

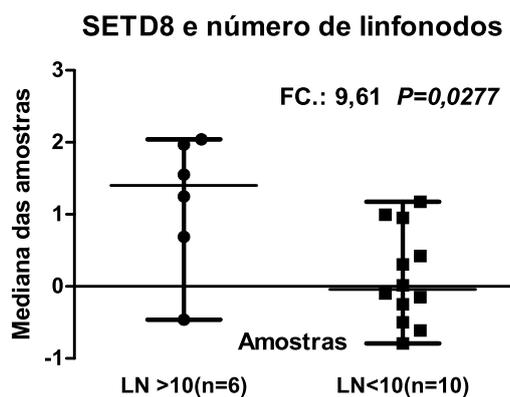


Figura 11. Expressão comparativa e número de linfonodos acometidos. LN= Linfonodos.  
FC= *Fold Change*. Teste de *Mann-Whitney*

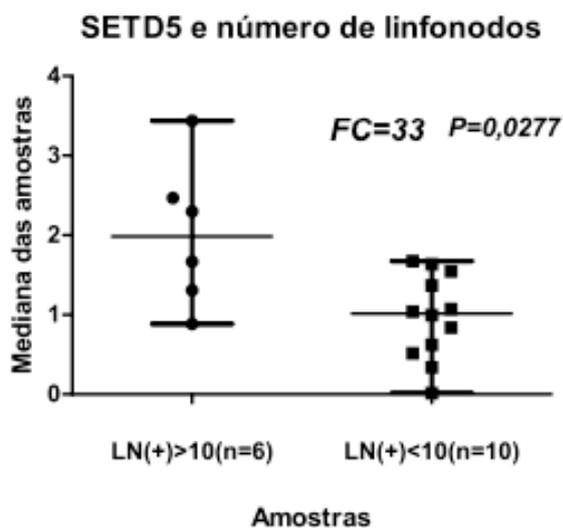


Figura 12 - Expressão comparativa e número de linfonodos acometidos. LN= Linfonodos.  
FC= *Fold Change*. Teste de *Mann-Whitney*

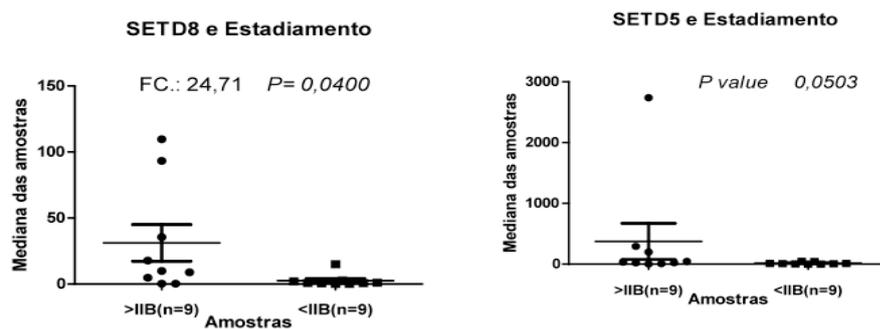


Figura 13 – Expressão relativa dos genes *SETD5* e *SETD8* de acordo com o estadiamento patológico.

#### 4.2.5 O Gene *SETD1B* e Amostras Pareadas de Câncer de Mama

Avaliamos de forma isolada do grupo total de amostras aquelas amostras que denominamos pareadas (n=14, 7 normais e 7 tumorais). Estas amostras têm como característica o fato da amostra tumoral e normal terem sido coletadas da mesma mama da paciente. Neste cenário clínico específico houve um expressão relativa aumentada do gene *SET1B* nas amostras tumorais quando comparado às contrapartes normais (Figura 13).

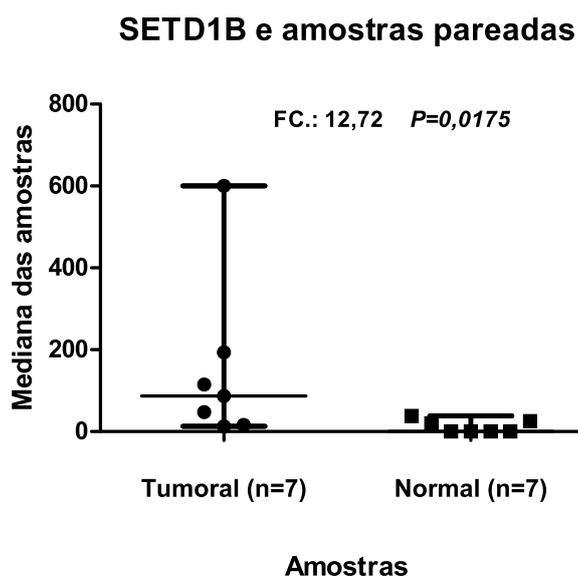


Figura 14 - Expressão relativa do *SETD1B* em amostras pareadas de câncer de mama. FC= *Fold Change*. Teste de *Mann-Whitney*

### 4.3 ESTUDOS DE CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

#### 4.3.1 *SET5* e *SETD8* : Correlação em *Pool* de Amostras Tumorais

Realizamos uma avaliação de correlação com teste de regressão linear entre as amostras de tecido tumoral de pacientes portadoras de câncer de mama (N=18). Há uma correlação de expressão entre os genes *SETD5* com o gene *SETD8* ( Figura 14).

#### SETD5 e SETD8 - Correlação em Pool de Amostras Tumorais

$$r^2=0,7471 \quad P < 0.0001$$

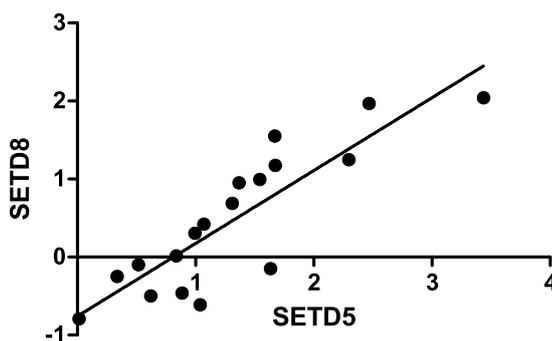
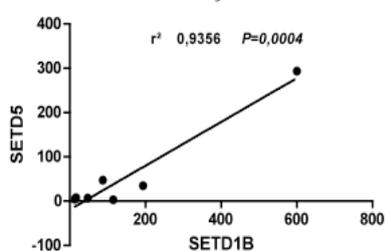


Figura 15 – Regressão Linear entre o *pool* de amostras tumorais

### 4.3.2. Estudo de Correlação nas Amostras Pareadas

Avaliamos de forma isolada do grupo total de amostras aquelas amostras que denominamos pareadas, ou seja, de cujo tecido tumoral e sua contraparte não-tumoral (normal) fora obtido da mesma paciente (n=14, 7 normais e 7 tumorais). Neste cenário clínico específico houve correlação de expressão do gene *SETD1B*, *SETD5*, *SETD8* e *SETMAR* testados através de avaliação de regressão linear. Quando testados nas amostras normais, não há qualquer tipo de correlação entre estes genes listados acima ( figuras 16-20).

SETD1B e SETD5 -Correlação em Amostras Pareadas



SETD1B e SETD5 - Amostras Normais Pareadas

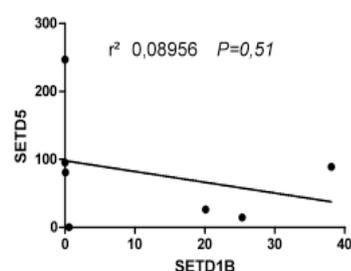
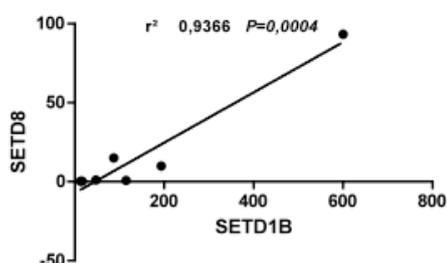


Figura 16 – Correlação da expressão dos genes *SETD1B* e *SETD5* entre amostras pareadas de tecidos tumorais e normais.

SETD1B e SETD8 - Correlação em Amostras Pareadas



SETD1B e SETD8 - Amostras Normais Pareadas

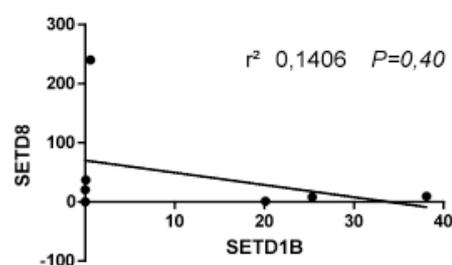
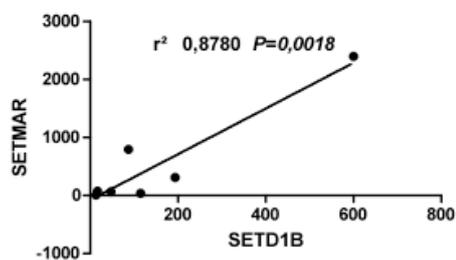


Figura 17 - Correlação da expressão dos genes *SETD1B* e *SETD8* entre amostras pareadas de tecidos tumorais e normais.

SETD1B e SETMAR - Correlação em Amostras Pareadas



SETD1B e SETMAR - Amostras Normais Pareadas

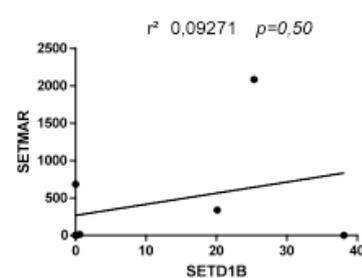
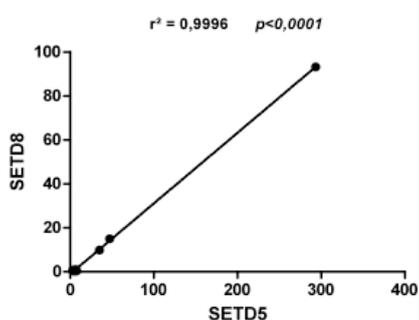


Figura 18 - Correlação da expressão dos genes *SETD1B* e *SETMAR* entre amostras pareadas de tecidos tumorais e normais.

SETD5 e SETD8 - Correlação em Amostras Pareadas



SETD5 e SETD8 - Amostras Normais Pareadas

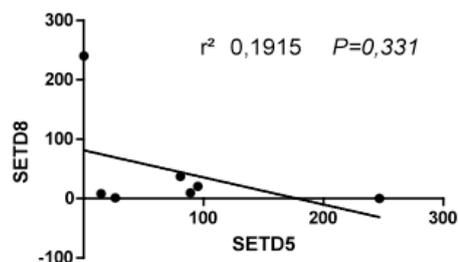
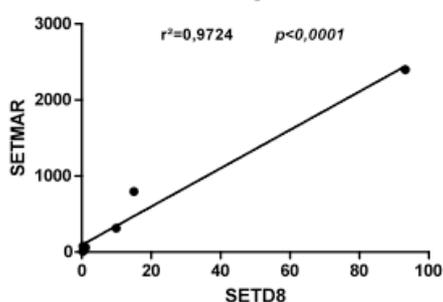


Figura 19 - Correlação da expressão dos genes *SETD5* e *SETD8* entre amostras pareadas de tecidos tumorais e normais.

SETD8 e SETMAR - Correlação em Amostras Pareadas



SETD8 e SETMAR - Amostras Normais Pareadas

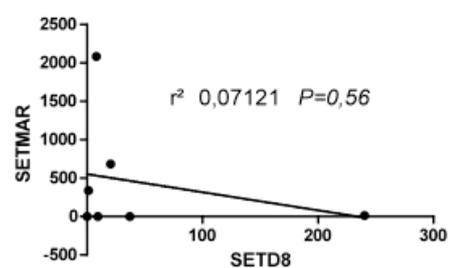


Figura 20 - Correlação da expressão dos genes *SETD8* e *SETMAR* entre amostras pareadas de tecidos tumorais e normais.

### 4.3.3 Estudo da correlação em amostras tumorais com presença do componente *in situ*

Realizamos a avaliação da correlação da expressão dos genes da família *SETD* através de regressão linear. Notamos que há uma correlação quase absoluta entre a expressão do gene *SETD5* e *SETD8* neste cenário clínico, sendo que não há esta correlação entre estes genes quando avaliamos as amostras sem presença do componente *in situ* (figura 21).

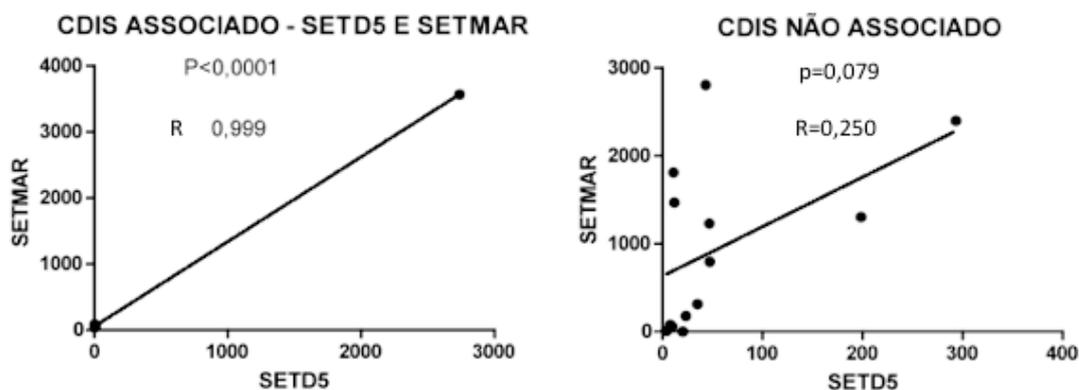


Figura 21 – Regressão Linear entre os genes *SETD5* e *SETMAR* em amostras tumorais que apresentam CDIS associado ao componente invasivo e entre as amostras tumorais que não apresentam esta característica. – CDIS – carcinoma ductal *in situ*

### 4.4. ESTUDOS DE EXPRESSÃO PROTÉICA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Avaliamos a expressão protéica dos genes *SETD1B*, *SETD5*, *SETD8*, *SETMAR* (genes que apresentaram expressão relativa aumentada com significância estatística em algum cenário clínico anterior) através de testes imuno-histoquímicos. Para tal foi usada lâmina MAT contendo 17 amostras com os tipos tumorais CDI e tumor metaplásico conforme previamente descrito. Neste cenário analisado, houve marcação da proteína *SETD1B* tanto no núcleo como no citoplasma de tumores de mama invasivos, porém sem diferença em relação aos tecidos normais (figura 22).

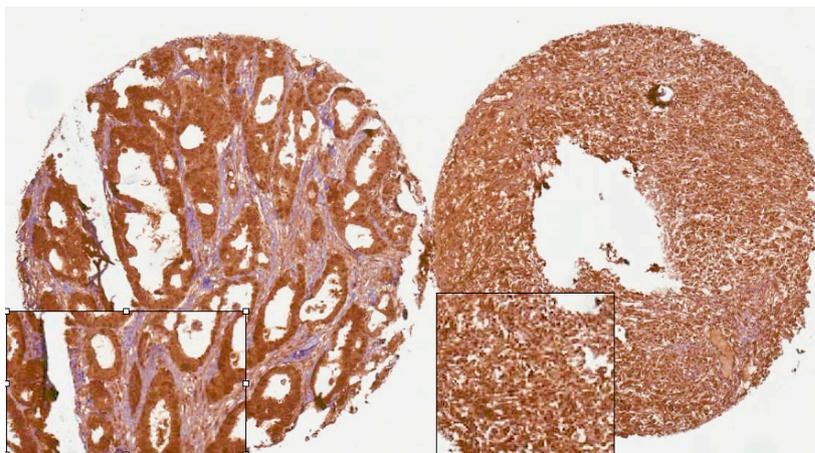


Figura 22 – Avaliação imuno-histoquímica da proteína SETD1B em tecido tumoral e normal. Há marcação nuclear e citoplasmática sem diferença entre tecido normal e tecido tumoral. Aumento 20x.

Para a proteína SETD8 foi observado o mesmo padrão imuno-histoquímico, com marcação citoplasmática e nuclear tanto em células tumorais invasivas como também no tecido normal adjacente aos tumores (figura 23).

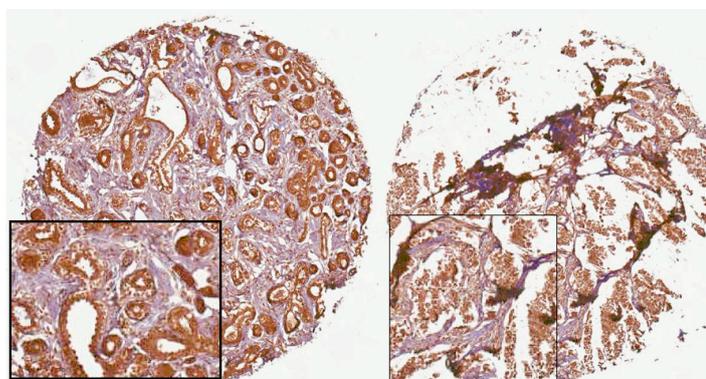


Figura 23 – Avaliação imuno-histoquímica da proteína SETD8 em tecido tumoral e normal. Houve marcação nuclear e citoplasmática em ambos os tecidos, sem diferença entre o tecido tumoral e normal. Aumento 20x

Para a proteína SETD5 houve marcação exclusiva em tumores do tipo carcinoma ductal *in situ*, não sendo detectada a presença da proteína nem em tumores invasivos nem em tecidos normais (figura 24). Interessantemente, a proteína SETMAR apresentou o mesmo tipo de distribuição tecidual, com expressão exclusiva em tumores do tipo carcinoma ductal *in situ* e baixa expressão em tumores invasivos e tecidos normais (figura 25).

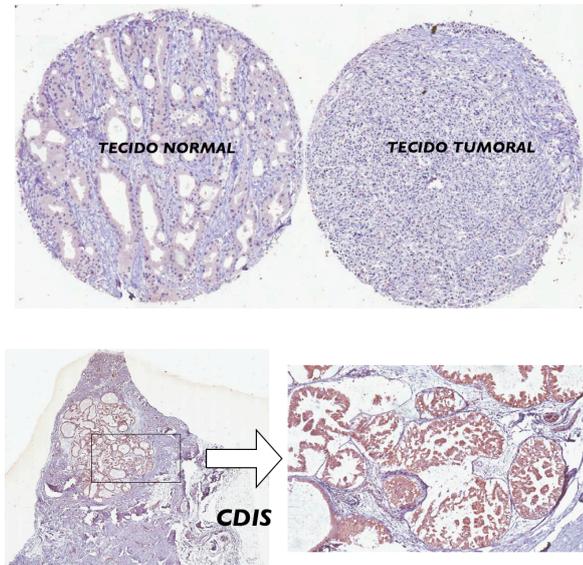


Figura 24 – Avaliação imuno-histoquímica do SETD5 em tecidos normais, tecido tumoral invasivo de câncer de mama e carcinoma ductal *in situ*. Não houve marcação em tecido tumoral invasivo ou em tecido normal. Houve porém uma marcação forte em carcinoma ductal *in situ*. Aumento 20x.

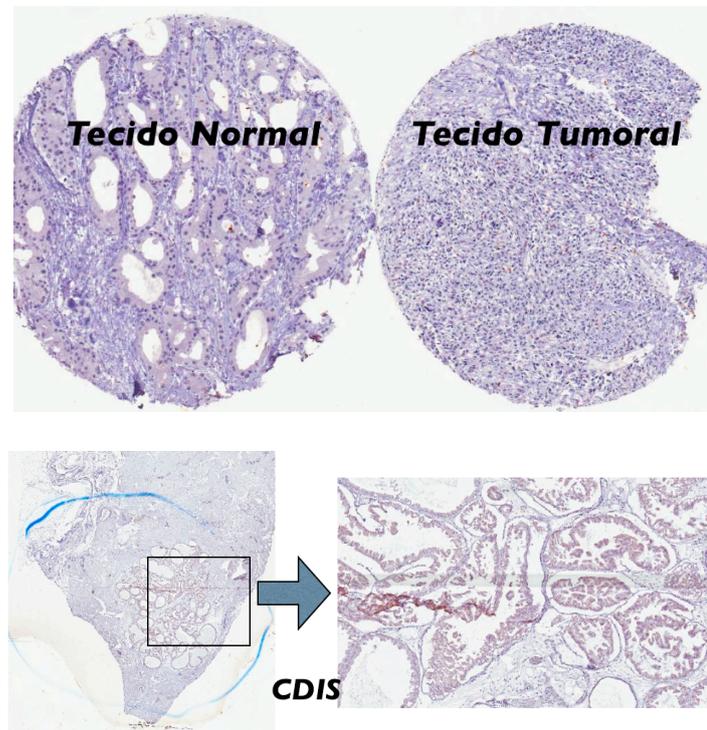


Figura 25 – Avaliação imuno-histoquímica do SETMAR em tecidos normais, tecido tumoral invasivo de câncer de mama, carcinoma ductal *in situ*. Não houve marcação em tecido normal ou em tecido tumoral invasivo. Houve marcação em carcinoma ductal *in situ*. Aumento 20x.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar do extenso conhecimento sobre fatores de risco relacionados ao câncer de mama, há ainda uma quantidade limitada de informação validada clinicamente sobre a carcinogênese mamária. Grande parte dos mecanismos biológicos envolvidos neste processo surgiram com os estudos do câncer de mama familiar. Com a descrição das mutações dos genes BRCA-1 e BRCA-2 e dos genes p53 e PTEN, uma parcela pequena dos tumores malignos de mama (em torno de 5%) começa a ter seu processo fisiopatológico molecular desvendado(4, 32). Além das mutações aberrantes da expressão genética e da estabilidade genômica, podem acontecer alterações genéticas e epigenéticas que funcionam como acontecimentos chave do câncer(49) .

Dentre as alterações epigenéticas importantes na carcinogênese humana, destacam-se aquelas relacionadas à metilação de proteínas histonas. O entendimento do padrão de expressão dos genes codificadores de metiltransferase e do seu papel fisiológico podem trazer um novo olhar sobre a carcinogênese humana.

O domínio SET tem como característica principal a sua capacidade de adicionar grupos metil tanto na estrutura da histona como em outros substratos não-histonas, com relevância em vários cenários tumorais.

A família de genes *SETD* codifica as proteínas com domínio SET, sendo composta por 10 genes: *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR*.

No presente estudo foi demonstrado que expressão do *SETMAR* está aumentada nas amostras teciduais de câncer de mama (n=18) quando comparadas as amostras de tecido normal de mama (n=13). Quando separamos das amostras tumorais apenas os pacientes com diagnóstico de câncer de mama do tipo triplo negativo (n=7) e comparamos com amostras normais de câncer de mama (n=13), a expressão deste gene ainda se mantém aumentada.

Este gene codifica uma proteína de fusão que contém um domínio N-terminal metiltransferase e um domínio transposase C-terminal. Em relação ao seu domínio

metiltransferase, ele metila a lisina 4 da histona 3(108-111). Seu papel na carcinogênese humana ainda não é completamente conhecido. Há algumas evidências que relacionam a sua atividade enzimática ao correto funcionamento do fuso mitótico. Quando as cromátides irmãs necessitam ser desenroladas durante a mitose num processo denominado decatenação, há atuação de uma enzima responsável por este processo denominada topo II alpha. Caso as cromátides irmãs não sejam desenroladas, elas ficam presas no fuso mitótico. Ficando presas no fuso, elas são destruídas através dos mecanismos de apoptose celular. Este processo se denomina *decatenation checkpoint*. A ação do *SETMAR* tem sido associada à perda do *decatenation checkpoint* em células tratadas com inibidores da topo II alpha. Com isso, células com alterações nos fusos mitóticos, e que podem gerar células com fusões gênicas anômalas, deleções, entre outras, seguem no ciclo celular(112), o que resulta em instabilidade genômica das células filhas, podendo levar a um fenótipo tumoral. Em células tumorais de câncer de mama, o silenciamento da enzima relacionada ao gene *SETMAR* (METNASE) levou à recuperação da sensibilidade da célula tumoral do câncer de mama a uma medicação quimioterápica denominada antraciclina, cujo principal alvo é a topo II alpha(113). Estes achados, associados aos nossos resultados, sugerem um papel na carcinogênese do câncer de mama deste gene. O fato de haver recuperação da sensibilidade a um agente quimioterápico em linhagem celular de câncer de mama também sugere um papel relevante na resistência ao tratamento com antracíclicos, droga que ainda é fundamental no tratamento de vários tipos de cânceres de mama, incluindo aí os tumores do tipo triplo negativo. Interessantemente, demonstramos que o *SETMAR* está presente apenas em carcinomas ductais in situ através de avaliação imuno-histoquímica. O carcinoma ductal in situ faz parte de um espectro histopatológico na carcinogênese do câncer de mama, estando situado entre a hiperplasia ductal atípica e o carcinoma invasivo(33). Dentre os genes envolvidos na progressão do carcinoma ductal in situ para carcinoma invasivo temos o silenciamento de genes supressores tumorais como o *TSF1*, *PE1*, *VHL*, *ER*, *RB1*, *WT2*, *NM23*, *EWS*, além da expressão aumentada de alguns proto-oncogenes como o *uPA*, *catepsina*, *colagenases* e *metaloproteinases*(33). Apostolou e colaboradores descreveram, em linhagem de células de câncer de intestino grosso e em células de câncer de intestino grosso humanas, que o *SETMAR* pode regular a expressão de

genes chave nestas células(117). Choi e colaboradores avaliaram, através de exames imuno-histoquímicos, a diferença de expressão protéica de genes relacionados a transição epitélio-mesênquima (expressão de vimentina, actina de músculo liso, osteonectina, N-caderina, perda de E-caderina, alteração de  $\beta$ -catenina) e marcadores de células troncos tumorais ( CD44(+)/CD24(-), ALDH1), além da avaliação do CD146, um indutor da transição epitélio-mesênquima, em carcinoma invasivo e carcinoma ductal *in situ*, demonstrando uma presença protéica aumentada, com significância estatísticas das proteínas actina de músculo liso, N-caderina, perda de E-caderina, alteração de  $\beta$ -catenina no carcinoma invasivo quando comparado ao carcinoma ductal *in situ*. Além disso, estes autores também demonstraram que há uma grande perda de E-caderina no carcinoma ductal invasivo quando comparado ao carcinoma *in situ* em tumores do subtipo *basal-like* (tripo-negativo)(118). No nosso estudo demonstramos que o gene *SETMAR* está hiperexpresso também no subtipo tripo negativo, assim como demonstramos, em amostras pareadas, que existe uma correlação de expressão do gene *SETD8* e do gene *SETMAR*. O *SETD8* está intrinsecamente vinculado a transformação epitélio-mesênquima(119). Avaliando de forma conjunta os dados da literatura com os dados gerados pelo nosso estudo também hipotetizamos que existe uma provável ação conjunta dos genes *SETD8* e *SETMAR* na aquisição, pela célula tumoral, da sua capacidade invasiva e na sua transformação inicial de tumor *in-situ* para tumor invasivo, o que mais uma vez justifica o fato de termos a expressão protéica do *SETMAR* apenas no carcinoma ductal *in-situ*. O banco de dados do *cBioPortal* do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* apresenta dados clínicos de sobrevida dos pacientes que apresentam expressão relativa aumentada do gene *SETMAR*. De 825 pacientes analisados, 40 apresentavam expressão relativa aumentada com sobrevida mediana de 81,58 meses e 778 pacientes não apresentavam expressão aumentada com sobrevida mediana de 113,74 meses, sendo esta diferença com significância estatística, como ilustrado na figura 26(120). Avaliando os dados da literatura juntamente com nossos achados, hipotetizamos que a expressão do *SETMAR* e sua ação protéica é um fenômeno precoce e inicial nas etapas da carcinogênese, modulando a expressão de uma série de outros genes envolvidos na transformação da carcinoma ductal *in situ* em carcinoma invasivo. Isso justificaria o achado da imunomarcagem apenas em CDIS pela imuno-histoquímica. O *The*

*Human Protein Atlas*, que é um banco de dados sobre estudos imuno-histoquímicos em células e tecidos humanos(121) não apresenta nenhum padrão de expressão para o SETMAR assim como não existem dados na literatura avaliando resultados de estudo imuno-histoquímico do SETMAR e câncer de mama.

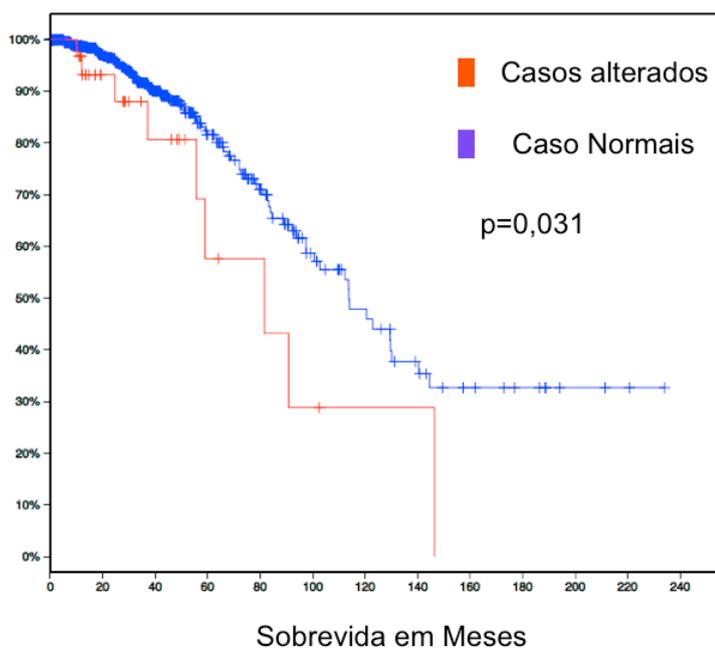


Figura 26 – SETMAR - Avaliação comparativa de sobrevida e expressão relativa. Curva de *Kaplan-Meier*

Estabelecido o diagnóstico de câncer de mama, uma série de análises posteriores necessitam ser realizadas para definição do prognóstico e definição de estratégias de tratamento. Os fatores prognósticos do câncer de mama, que hoje são avaliados através da história clínica, análise histopatológica do tumor e do estudo do perfil imuno-histoquímico são ferramentas essenciais para o correto julgamento clínico.

A invasão angiolinfática é um marcador de mal prognóstico em câncer de mama com risco aumentado de recidiva tumoral e morte (122). Quando esta situação está presente, a célula tumoral é capaz de sair do seu local de origem e acessar vasos linfáticos e sanguíneos, com risco de disseminação metastática para linfonodos axilares e outros órgãos. Este cenário clínico está fortemente associado à capacidade de invasão da célula tumoral, sendo este um dos seis *hallmarks* descritos por Hanahan e Weinberg (20). O passo inicial do processo de invasão

angiolímfática é dependente da transformação epitélio-mesenquimal da célula tumoral, como demonstrado por Yang e colaboradores. As características fenotípicas das células que sofrem esta transformação são: mobilidade, invasividade e resistência a apoptose. Estas características fenotípicas estão associadas a desregulação de alguns processos moleculares, entre eles fatores de crescimento e fatores de transcrição como o TWIST, HIF1, NF- $\kappa$ B. O SETD8 está envolvido na transição epitélio-mesênquima através da associação com a proteína TWIST e que está positivamente correlacionado com aumento da expressão de TWIST e N-caderina em câncer de mama metastático (119). Em nosso estudo encontramos um aumento relativo da expressão do gene *SETD8* em pacientes portadores de invasão angiolímfática, em pacientes com forte carga axilar tumoral e em estadios avançados. Este resultado corrobora a tese de que o *SETD8* está realmente envolvido na transição epitélio-mesênquima. Apesar da significativa diferença de expressão do gene *SETD8* em pacientes com invasão angiolímfática, em nossa análise imunohistoquímica, encontramos a presença do SETD8 tanto em tecidos tumorais invasivos de câncer de mama como em tecidos normais peritumorais, sem diferença aparente entre estes dois grupos (figura 22). O gene *SETD8* é responsável pela síntese da enzima de mesmo nome que promove a monometilação da lisina 20 da histona 4 (H4K20me). Rice e colaboradores demonstraram que este gene apresenta uma variação importante dentro do ciclo celular, estando praticamente ausente nas fases G e S e, contudo, estando presente, de forma intensa, nas outras fases do ciclo celular (103). Estes achados sugerem que este gene desempenha um papel importante na manutenção fisiológica do ciclo celular. A depleção do *SETD8* em vários modelos animais resulta em defeitos de crescimento e de controle do ciclo celular, com células parando na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular, não havendo desta maneira a condensação de cromossomos para entrada na mitose (103). Estes achados indicam que H4K20me1 é essencial para entrada da célula na mitose. Após seu aumento no início do ciclo celular, SETD8 é estabilizado e foge da degradação por ubiquinização através de fosforilação realizada pela ciclina CDK1. Posteriormente acontece desfosforilação pela fosfatase Cdc14 e degradação através da ubiquitinização pelo APC. Durante a fase S há um nível aumentado de transcrição do gene *SETD8* sem aumento da própria proteína. Isso ocorre devido a degradação quase imediata pela enzima ubiquitina ligase CRL4<sup>CDT2</sup> (123). Estes achados,

resumidos na figura 27, sinalizam que a necessidade fisiológica da presença do SETD8 no ciclo celular normal, assim como sua transcrição aumentada sem presença proteica marcante na fase S por degradação podem justificar um aumento relativo na transcrição na avaliação por q-PCR porém com imuno-histoquímica sem diferença na imunomarcagem. É importante salientar que o tecido utilizado como tecido normal na lâmina de MAT para imuno-histoquímica, foi obtido da região peritumoral, e é sabido que os processos biológicos envolvidos no ambiente tumoral podem também estar presentes no ambiente peritumoral (81). Dessa forma, o fato da imunomarcagem para o SETD8 não apresentar diferença significativa entre as amostras analisadas pode também estar relacionada à origem do tecido utilizado na lâmina de MAT. O banco de dados *The Human Protein Atlas* também não apresenta nenhum registro de estudo imuno-histoquímico com esta proteína em câncer de mama ou tecido normal de mama.

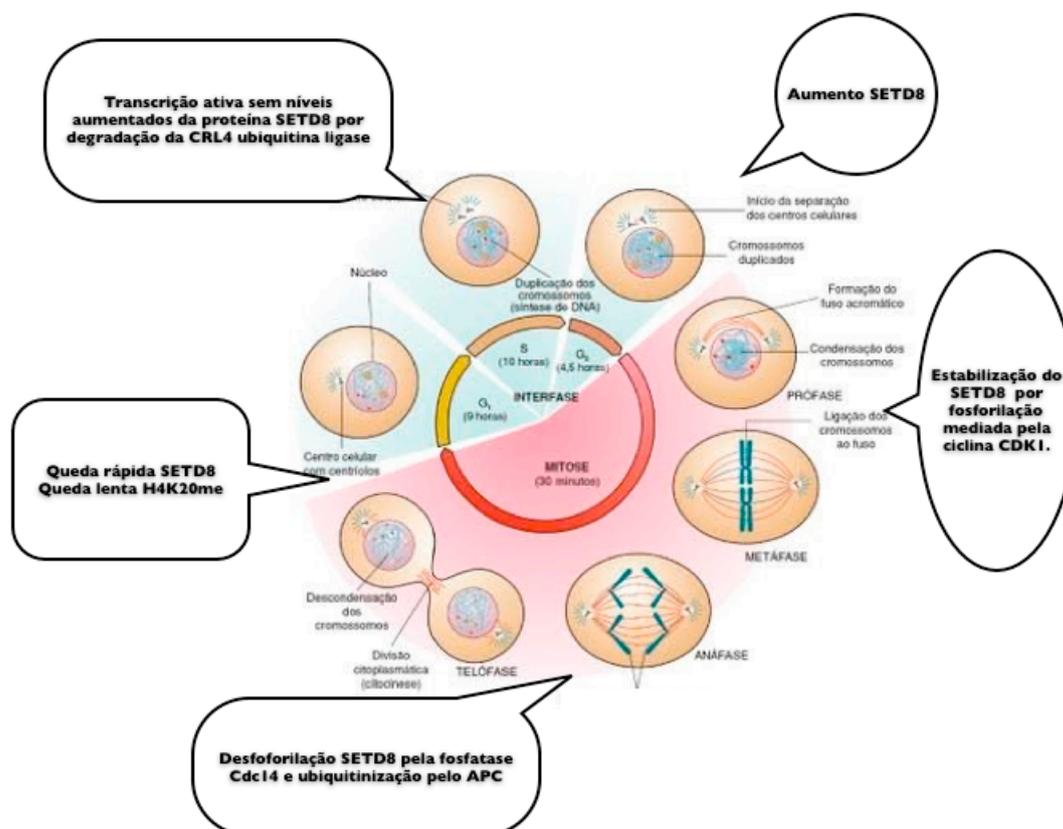


Figura 27 – Representação esquemática da variação do SETD8 no ciclo celular.

No nosso estudo demonstramos que o gene *SETD5* também se encontra com expressão aumentada em pacientes com mais de 09 linfonodos e com estadiamento acima do estadio IIB, além de um forte tendência a expressão relativa aumentada em tumores com invasão angiolinfática. Isto tem uma implicação direta no prognóstico do paciente. A taxa de sobrevida em cinco anos são de 95, 85, 70, 52, 48 e 18% de acordo para os estadios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV respectivamente (124). Ou seja, acima do estadio IIB é o ponto onde notamos a maior queda de sobrevida, exatamente no estadio acima do qual nossos genes estão hiperexpressos e correlacionados. Não há, até o momento, nenhum relato na literatura sobre o eventual papel do gene *SETD5* na carcinogênese e não temos nenhum dado sobre o seu papel em qualquer tipo de cenário tumoral. Semelhante ao descrito para o gene *SETMAR*, o gene *SETD5* só apresentou marcação imuno-histoquímica em tumores do tipo CDIS, não havendo marcação em tecidos normais ou tecidos tumorais invasivos. Em consulta a base de dados *THE HUMAN PROTEIN ATLAS*, notamos que há uma imunomarcação sempre muito intensa em tumores ductais *in-situ* e lobular *in-situ*, apesar da marcação fraca em tecidos tumorais invasivos, como ilustrado na figura 28. Hipotetizamos, novamente, que a expressão do *SETD5* e sua ação protéica é um fenômeno precoce e inicial nas etapas da carcinogênese, modulando a expressão de uma série de outros genes envolvidos na transformação da carcinoma ductal *in situ* em carcinoma invasivo. Isso justificaria o achado da imunomarcação apenas em CDIS pela imuno-histoquímica assim como também a expressão gênica relativa continuada em pacientes com elevado número de linfonodos.

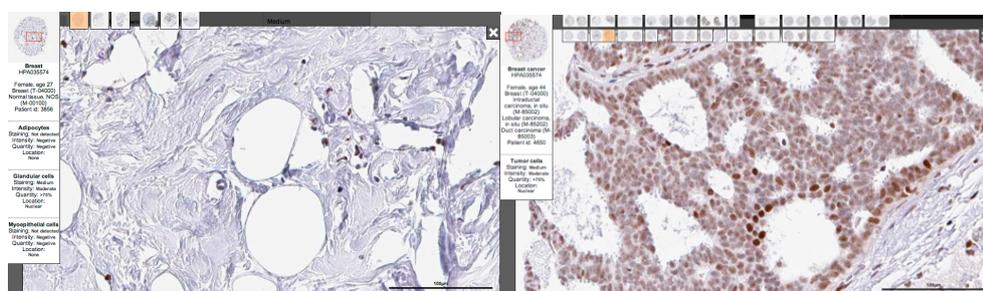


Figura 28 – Imuno-histoquímica SETD5: tecido normal e carcinoma *in-situ* – *The Human Protein Atlas*(121)

Com o conjunto de dados acima, conseguimos vincular a hiperexpressão

dos genes *SETD8* e *SETD5* à capacidade invasiva da célula tumoral. Chama atenção ainda o fato do gene *SETD5* estar sempre em associação com o gene *SETD8* nestes cenários de mal prognóstico, inferindo uma possível interação fisiopatológica molecular entre estes dois genes.

Demonstramos ainda o aumento da expressão relativa do gene *SETD1B* em amostras tumorais pareadas de câncer de mama. Existem poucos dados da literatura sobre o papel deste gene na carcinogênese. Num estudo de microarranjo em câncer de esôfago, Song e colaboradores demonstraram mutação do gene *SETD1B* em dois tumores (81). Choi e colaboradores conseguiram demonstrar que há uma correlação entre mutações não-silenciosas do gene *SETD1B* e instabilidade de microssatélites em tumores de intestino grosso e em tumores gástricos(80). Não há, até o momento, relatos na literatura médica sobre o provável papel do *SETD1B* em câncer de mama. Semelhante aos achados de Choi e colaboradores em câncer de intestino grosso e em câncer gástrico, a marcação imuno-histoquímica demonstrou a presença a nível protéico do gene tanto no núcleo como no citoplasma, sem diferença entre tecidos normais e tumorais, nas nossas amostras de MAT.

Um achado relevante do nosso estudo é a forte correlação demonstrada através de teste de regressão linear entre os genes *SETD5* e *SETD8* em amostras tumorais com invasão angiolímfática, e entre os genes *SETD1B*, *SETD5*, *SETD8* e *SETMAR* em amostras tumorais pareadas de câncer de mama com ausência de qualquer correlação entre estes genes nas amostras normais pareadas. Este achado sugere fortemente que sempre que há uma ação biológica de algum destes genes, esta ação vai necessariamente desencadear uma ação de um outro gene correlacionado, vinculando desta maneira a grande possibilidade da participação coordenada destes vários genes na carcinogênese do câncer de mama como demonstrada na figura 29.

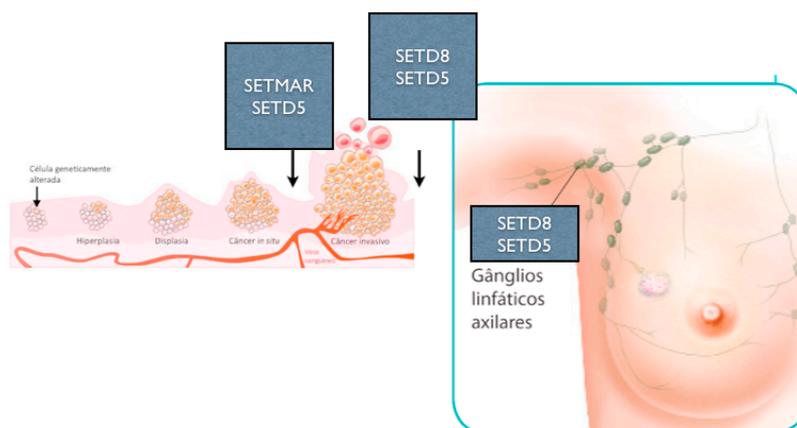


Figura 29 – Modelo de participação coordenada dos genes da família SETD em câncer de mama

## 6 CONCLUSÕES

- . *SETMAR* está envolvido na carcinogênese de mama. O fato deste gene conferir capacidade de resistência aos quimioterápicos antracíclicos também traz grande interesse, pois o possível bloqueio da sua proteína poderá conferir nova sensibilidade à essas drogas;
- . *SETD8* está envolvido na capacidade de invasão da célula tumoral;
- . *SETD5* parece ter um papel importante também na capacidade de invasão da célula tumoral;
- . Tanto *SETMAR* quanto *SETD5* mostraram marcação específica para carcinoma ductal *in-situ*.
- . *SETD5* e *SETD8* estão associados em quase todos os cenários implicados com alta capacidade invasiva celular tumoral;
- . *SETD1B* está hiperexpresso em amostras tumorais das pacientes que apresentam amostras pareadas e nas amostras triplo negativas;
- . Os dados sugerem fortemente ação conjunta do gene *SETD5* e *SETD8* para a célula tumoral adquirir características de invasão. Especulamos que estes genes podem funcionar como um fator prognóstico assim como um alvo terapêutico. A simples presença no tumor poderá indicar necessidade de tratamento complementar devido ao risco de invasão do sistema linfático ou sanguíneo. O bloqueio das proteínas codificadas por estes genes nas células tumorais do câncer de mama pode impedir a invasão deste sistemas, mudando de forma marcante a história natural desta doença.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Globocan. International Agency for Research on Cancer Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [cited 2013 12/12/2013]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(2):74-108.
4. Brazil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (MS. INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro : Inca, 2013 [30/12/2013]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>.
5. Esserman LJ, Shieh Y, Rutgers EJ, Knauer M, Retel VP, Mook S, et al. Impact of mammographic screening on the detection of good and poor prognosis breast cancers. *Breast cancer research and treatment*. 2011;130(3):725-34.
6. Edge SB BD, Compton CC, et al (Eds). *AJCC (American Joint Committee on Cancer). Cancer Staging Manual, 7th edition*, Springer-Verlag, New York . p.347). 2010.
7. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer*. 2005;93(9):1046-52.
8. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(10):1515-38.
9. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *The breast journal*. 2009;15(6):593-602.
10. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(24):6100-10.
11. Moolgavkar SH, Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 1981;66(6):1037-52.
12. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2941-53.
13. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 1998;153(2):333-9.
14. Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res*. 1991;51(18 Suppl):5023s-5044s.
15. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1997;18(5):869-82.
16. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):519-27.
17. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*. 1989;49(14):3713-21.

18. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991;51(12):3075-9.
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer. *Cell.* , Vol. 2000; 100: 57–70.
20. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011; 144: 646-674.
22. Adami HO, Persson I, Ekblom A, Wolk A, Pontén J, Trichopoulos D. The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutat Res.* 1995;333(1-2): 29-35.
23. Skegg DC. Risk assessment issues in breast cancer. *Mutat Res.* 1995;333(1-2):51-8.
24. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000 Sep 9;321(7261):624-8.
25. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2012;62(1):10-29.
26. Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV, Jr., Albanes D, Ballard-Barbash R, Adams KF, et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. *Archives of internal medicine.* 2007;167(19):2091-102.
27. Alsaker MD, Janszky I, Opdahl S, Vatten LJ, Romundstad PR. Weight change in adulthood and risk of postmenopausal breast cancer: the HUNT study of Norway. *British journal of cancer.* 2013;109(5):1310-7.
28. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2006;296(2):193-201.
29. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2004;111(5):762-71.
30. Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, et al. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer causes & control : CCC.* 2002;13(8):741-51.
31. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American journal of epidemiology.* 2000;152(6):514-27.
32. Kluttig A, Schmidt-Pokrzywniak A. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. *Breast Care (Basel).* 2009; 4(2): 82–87.
33. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine.* 1997;75(6):429-39.
34. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(2):127-35.
35. Jenuwein T, Allis C. Translating the histone code. *Science.* 2001; 293(5532): 1074-80.
36. Thompson E, Travers A. Drosophila Smyd4 homologue is a muscle-specific transcriptional modulator involved in development. *PLoS One.* 2008; 3(8) :e3008.
37. Strahl B, Allis C. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403(6765):41-5.
38. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J.* 2009; 50(4): 455-63.

39. VG Allfrey, R Faulkner, Mirsky A. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964; 51: 786-94.
40. Luger. K, Maeder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; 389: 251-259.
41. Hamon MA, Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe*. 2008; 14;4(2):100-9.
42. Spannhoff A, Hauser AT, Heinke R, Sippl W, Jung M. The Emerging Therapeutic Potential of Histone Methyltransferase and Demethylase Inhibitors. *Chem Med Chem*. 2009; (4): 1568-1582.
43. Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(9):863-8.
44. Pierce BA. Controle da expressão gênica. In:\_\_\_\_\_. *Genética: um enfoque conceitual*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 421-49.
45. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):143-53.
46. Wolffe AP, Guschin D. Chromatin structural features and targets that regulate transcription. *Journal of Structural Biology, Amsterdam*. 2000; 129: 102–122.
47. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):343-57.
48. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(11):838-49.
49. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150(1):12-27.
50. Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res*. 2012;318(4):299-310.
51. Varier RA, Timmers HT. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815(1):75-89.
52. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr*. 2009; (2):243-51.
53. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429 (6990): 457-463.
54. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 27-36.
55. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:243-63.
56. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer*. 2009;100(4):571-7.
57. Albert M, Helin K. Histone methyltransferases in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, n. 21, p. 209–220, 2010.
58. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.
59. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(6):376-92.
60. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(6):1409-20.
61. Fog CK, Jensen KT, Lund AH. Chromatin-modifying proteins in cancer. *APMIS*. 2007; 115(10):1060-1089.

62. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.
63. Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2012;44(1):14-27.
64. Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics.* 2009;36(2):75-88.
65. Herceg Z. Epigenetic information in chromatin and cancer. *Eur J Cancer.* 2009;45 Suppl 1:442-4.
66. Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen AK, Henriques JA. What histone code for DNA repair? *Mutat Res.* 2008;658(3):259-70.
67. Altaf M, Saksouk N, Côté J. Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat Res.* 2007;618(1-2):81-90.
68. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet.* 2002;12(2) 142-8.
69. Füllgrabe, J, Kavanagh E, Joseph B: Histone onco-modifications. *Oncogene* 2011,30(31):3391-403.
70. Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5):297-311.
71. Cross NC. Histone modification defects in developmental disorders and cancer. *Oncotarget.* 2012;3(1):3-4.
72. Chuikov, S, Kurash, JK, Wilson, JR, Xiao, B, Justin, N, Ivanov, GS, Mckinney, K, Tempst, P, Prives, C, Gamblin, SJ, Barlev, NA, Reinberg, D: Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature.* 2004, 432:353–360.
73. Kouskouti A, Scheer E, Staub A, Tora L, Talianidis I: Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol Cell.* 2004, 14(2):175-82.
74. Min J, Zhang X, Cheng X, Grewal SI, Xu RM. Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nature structural biology.* 2002;9(11):828-32.
75. Zhang X, Tamaru H, Khan SI, Horton JR, Keefe LJ, Selker EU, et al. Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell.* 2002;111(1):117-27.
76. Lee JH, Skalnik DG. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(50):41725-31.
77. Yadav S, Singhal J, Singhal SS, Awasthi S. hSET1: a novel approach for colon cancer therapy. *Biochemical pharmacology.* 2009;77(10):1635-41.
78. Simpson NE, Tryndyak VP, Pogribna M, Beland FA, Pogribny IP. Modifying metabolically sensitive histone marks by inhibiting glutamine metabolism affects gene expression and alters cancer cell phenotype. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society.* 2012;7(12):1413-20.
79. Lee JH, Tate CM, You JS, Skalnik DG. Identification and characterization of the human Set1B histone H3-Lys4 methyltransferase complex. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(18):13419-28.
80. Choi YJ, Oh HR, Choi MR, Gwak M, An CH, Chung YJ, et al. Frameshift mutation of a histone methylation-related gene SETD1B and its regional heterogeneity in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. *Human pathology.* 2014;45(8):1674-81.
81. Song Y, Li L, Ou Y, Gao Z, Li E, Li X, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature.* 2014;509(7498):91-5.

82. Rusiniak ME, Kunnev D, Freeland A, Cady GK, Pruitt SC. Mcm2 deficiency results in short deletions allowing high resolution identification of genes contributing to lymphoblastic lymphoma. *Oncogene*. 2012;31(36):4034-44.
83. Sun XJ, Wei J, Wu XY, Hu M, Wang L, Wang HH, et al. Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(42):35261-71.
84. Zhang K, Haversat JM, Mager J. CTR9/PAF1c regulates molecular lineage identity, histone H3K36 trimethylation and genomic imprinting during preimplantation development. *Developmental biology*. 2013;383(1):15-27.
85. Simon JM, Hacker KE, Singh D, Brannon AR, Parker JS, Weiser M, et al. Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects. *Genome research*. 2013.
86. Gossage L, Murtaza M, Slatter AF, Lichtenstein CP, Warren A, Haynes B, et al. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2014;53(1):38-51.
87. Buck MJ, Raaijmakers LM, Ramakrishnan S, Wang D, Valiyaparambil S, Liu S, et al. Alterations in chromatin accessibility and DNA methylation in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2013.
88. Al Sarakbi W, Sasi W, Jiang WG, Roberts T, Newbold RF, Mokbel K. The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. *BMC cancer*. 2009;9:290.
89. Newbold RF, Mokbel K. Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis. *Anticancer research*. 2010;30(9):3309-11.
90. Patani N, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Anticancer research*. 2011;31(12):4115-25.
91. Kim DW, Kim KB, Kim JY, Seo SB. Characterization of a novel histone H3K36 methyltransferase setd3 in zebrafish. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2011;75(2):289-94.
92. Chen Z, Yan CT, Dou Y, Viboolsittiseri SS, Wang JH. The role of a newly identified SET domain-containing protein, SETD3, in oncogenesis. *Haematologica*. 2013;98(5):739-43.
93. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000;405(6784):311-9.
94. Sun XJ, Xu PF, Zhou T, Hu M, Fu CT, Zhang Y, et al. Genome-wide survey and developmental expression mapping of zebrafish SET domain-containing genes. *PloS one*. 2008;3(1):e1499.
95. Arantes Faria JAQ, Resende Corrêa NC, de Andrade C, de Angelis Campos AC, de Almeida RDSS, et al. (2013) SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation. *J Cancer Sci Ther* 5:058-065.
96. Muzny DM, Scherer SE, Kaul R, Wang J, Yu J, Sudbrak R, et al. The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. *Nature*. 2006;440(7088):1194-8.
97. Binda O, Sevilla A, LeRoy G, Lemischka IR, Garcia BA, Richard S. SETD6 monomethylates H2AZ on lysine 7 and is required for the maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2013;8(2):177-83.

98. Del Rizzo PA, Trievel RC. Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2011;6(9):1059-67.
99. Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Molecular cell*. 2001;8(6):1207-17.
100. Hu HY, Li KP, Wang XJ, Liu Y, Lu ZG, Dong RH, et al. Set9, NF-kappaB, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(1):157-66.
101. Cho HS, Suzuki T, Dohmae N, Hayami S, Unoki M, Yoshimatsu M, et al. Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. *Cancer research*. 2011;71(3):655-60.
102. Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, et al. Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Molecular cell*. 2008;30(3):336-47.
103. Wu S, Rice JC. A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell cycle*. 2011;10(1):68-72.
104. Yu N, Huangyang P, Yang X, Han X, Yan R, Jia H, et al. microRNA-7 suppresses the invasive potential of breast cancer cells and sensitizes cells to DNA damages by targeting histone methyltransferase SET8. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(27):19633-42.
105. Zhang BL, Song FJ, Zheng H, Zhang LN, Zhao YR, Chen KX. [SNP rs16917496 within SET8 3'UTR is associated with the age of onset of breast cancer]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 2012;34(11):835-7.
106. Song F, Zheng H, Liu B, Wei S, Dai H, Zhang L, et al. An miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the SET8 gene is associated with early age of breast cancer onset. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(19):6292-300.
107. Wang C, Guo Z, Wu C, Li Y, Kang S. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the SET8 gene is associated with the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer genetics*. 2012;205(7-8):373-6.
108. Guo Z, Wu C, Wang X, Wang C, Zhang R, Shan B. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3'-untranslated region of the histone methyltransferase SET8 is associated with hepatocellular carcinoma outcome. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;131(6):1318-22.
109. Beck BD, Lee SS, Williamson E, Hromas RA, Lee SH. Biochemical characterization of metnase's endonuclease activity and its role in NHEJ repair. *Biochemistry*. 2011;50(20):4360-70.
110. De Haro LP, Wray J, Williamson EA, Durant ST, Corwin L, Gentry AC, et al. Metnase promotes restart and repair of stalled and collapsed replication forks. *Nucleic acids research*. 2010;38(17):5681-91.
111. Shaheen M, Williamson E, Nickoloff J, Lee SH, Hromas R. Metnase/SETMAR: a domesticated primate transposase that enhances DNA repair, replication, and decatenation. *Genetica*. 2010;138(5):559-66.
112. Williamson EA, Rasila KK, Corwin LK, Wray J, Beck BD, Severns V, et al. The SET and transposase domain protein Metnase enhances chromosome decatenation: regulation by automethylation. *Nucleic acids research*. 2008;36(18):5822-31.
113. Wray J, Williamson EA, Sheema S, Lee SH, Libby E, Willman CL, et al. Metnase mediates chromosome decatenation in acute leukemia cells. *Blood*. 2009;114(9):1852-8.

114. Wray J, Williamson EA, Royce M, Shaheen M, Beck BD, Lee SH, et al. Metnase mediates resistance to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cells. *PloS one*. 2009;4(4):e5323.
115. Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real time quantitative PCR. Applied Biosystems, 2008.
116. Soares VPdAIWdCEMdSFAYSSdSFNFA. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2007;43(1).
117. Apostolou P, Toloudi M, Kourtidou E, Mimikakou G, Vlachou I, Chatziioannou M, et al. Potential role for the Metnase transposase fusion gene in colon cancer through the regulation of key genes. *PloS one*. 2014;9(10):e109741.
118. Choi Y, Lee HJ, Jang MH, Gwak JM, Lee KS, Kim EJ, et al. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Human pathology*. 2013;44(11):2581-9.
119. Yang F, Sun L, Li Q, Han X, Lei L, Zhang H, et al. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *The EMBO journal*. 2012;31(1):110-23.
120. Gao et al. *Sci. Signal*. 2013 & Cerami et al. *Cancer Discov*. 2012
121. <http://www.proteinatlas.org/search/SETD5> - Consultado em 29/01/2015.
122. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1994;24(1):41-7.
123. Wu S, Wang W, Kong X, Congdon LM, Yokomori K, Kirschner MW, et al. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes & development*. 2010;24(22):2531-42.
124. Newman LA. Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Seminars in radiation oncology*. 2009;19(4):195-203.

## 8 APÊNDICE

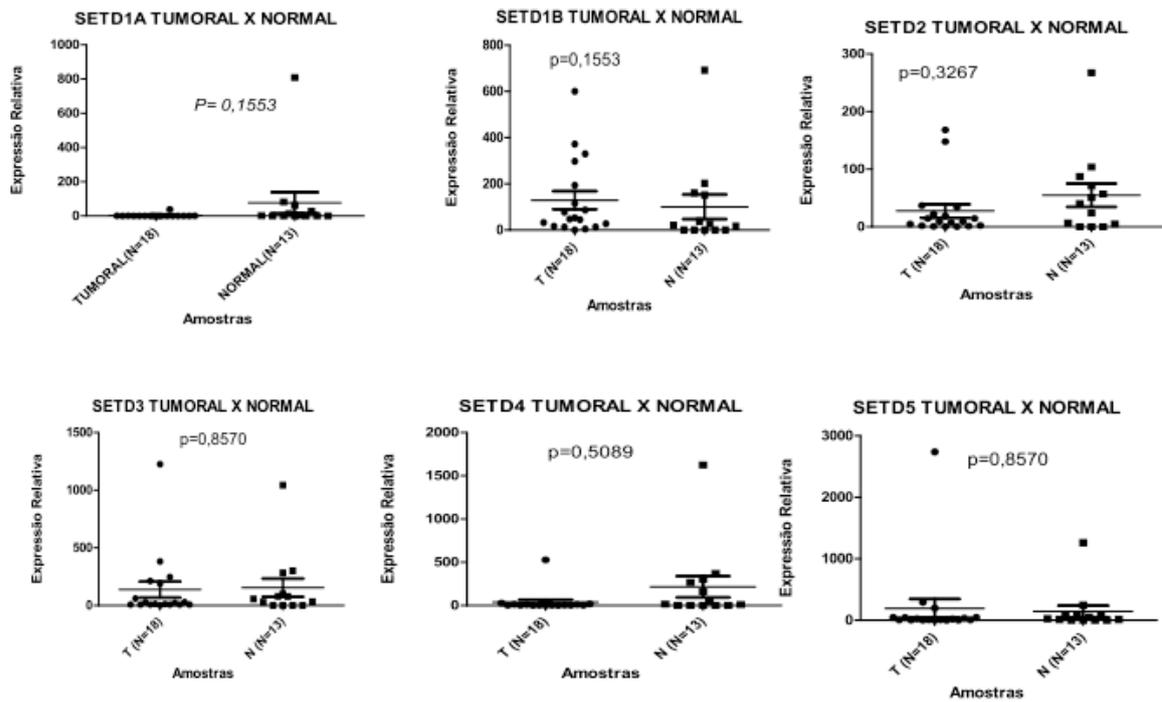


Figura 30 - Expressão relativa dos genes *SETD1A* até o gene *SETD5* entre amostras tumorais e normais. Todos os dados não tiveram significância estatística.

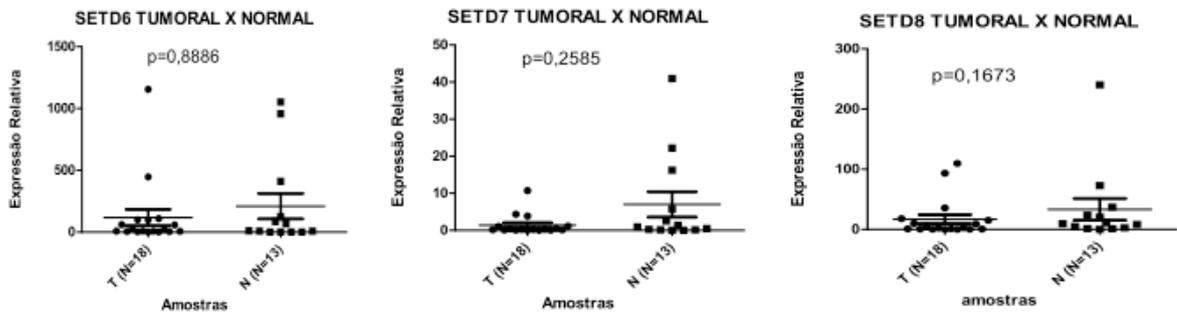


Figura 31 - Expressão relativa dos genes *SETD6* até o gene *SETD8* entre amostras tumorais e normais. Todos os dados não tiveram significância estatística.

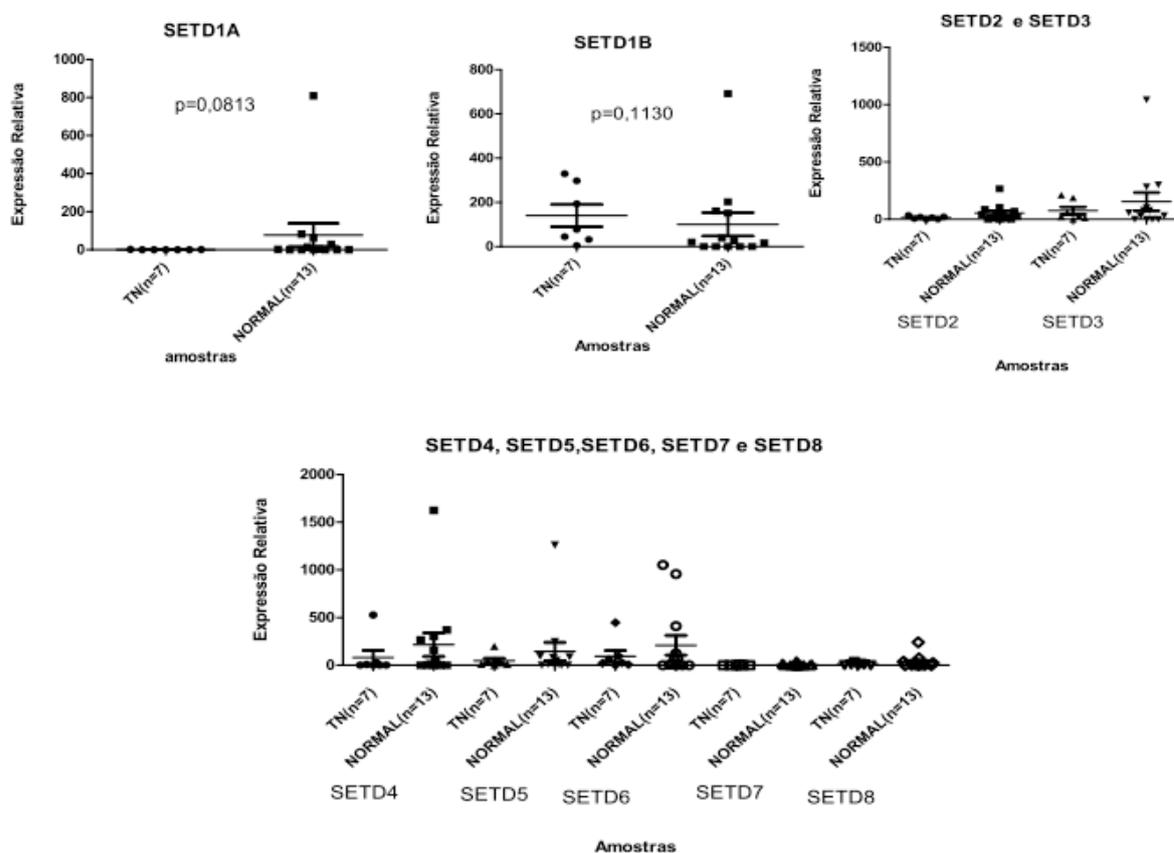


Figura 32 - Expressão comparativa dos genes da família SETD entre amostras tumorais triplo negativas e amostras normais. Dados sem significância estatística.

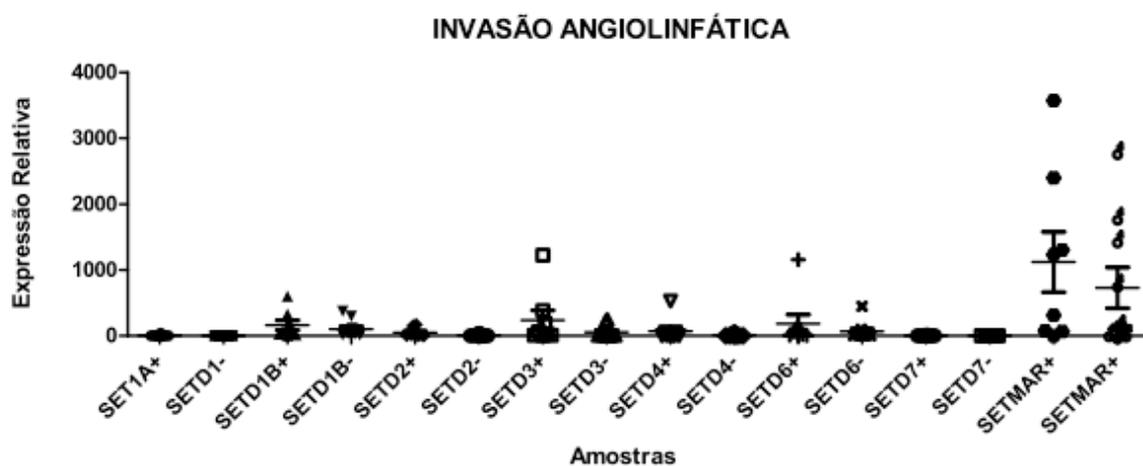


Figura 33 - Expressão relativa dos genes da família SETD que não demonstraram significância estatística na associação entre invasão angirolinfática.

