



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA LAINO DO VAL CARNEIRO

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DO MALONDIALDEÍDO E
EXPRESSÃO DO RNAM CXCR4 EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Londrina
2008

JULIANA LAINO DO VAL CARNEIRO

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DO MALONDIALDEÍDO E
EXPRESSÃO DO RNAM CXCR4 EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C289n Carneiro, Juliana Laino do Val.
Níveis plasmáticos do malondialdeído e expressão do RNAm CXCR4 em células do sangue periférico de pacientes com câncer de mama / Juliana Laino do Val Carneiro. – Londrina, 2008.
121 f. : il.

Orientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Mamas – Câncer – Teses. 3. Malondialdeído – Teses. I. Watanabe, Maria Angélica Ehara. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.092

JULIANA LAINO DO VAL CARNEIRO

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DO MALONDIALDEÍDO E
EXPRESSÃO DO RNAM CXCR4 EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita
Filho

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de Setembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para continuar estudando.

Aos meus queridos pais, Aurélio e Maria Thereza que são os meus grandes exemplos de trabalho e caráter, pela força e incentivo nos estudos e aos meus queridos irmãos, Patrícia e Marco Aurélio, por todo amor e carinho.

À minha orientadora, pesquisadora admirável, acima de tudo, uma pessoa maravilhosa, pela qual guardo um enorme carinho e admiração. Agradeço infinitamente pela amizade e pelo conhecimento adquirido em seu laboratório, que fez com que abrissem as portas para novas oportunidades. A ela, serei eternamente grata.

Ao Instituto de Câncer de Londrina e ao professor Mário Sérgio Mantovani, pelo fornecimento das amostras.

À professora Suzana Nixdorf, bem como ao Bruno Faris por sua gentil solicitude e colaboração neste trabalho, e à equipe de laboratório da prof^a Suzana, principalmente ao Patrick e Mateos, pela ajuda nos experimentos.

À professora Maria Helena P. Fungaro que permitiu o acesso ao seu laboratório e aos recursos nele disponíveis.

Aos grandes amigos do laboratório, Mateus, Marla, Patrícia, Karen, Julie, Thiago e Roberto pela enorme amizade, pelos incontáveis momentos agradáveis e pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, Juliana, Daniel, Marcelo, Manú, Carla, Lígia, Daniela e Lara, pela amizade e boa vontade em ajudar.

Aos meus familiares, principalmente aos meus avós Roberto e Jeorgina por todo carinho recebido nos finais de semana em sua casa.

À minhas amigas de infância, Laura, Simone e Júlia, aos meus amigos da graduação e da pós-graduação.

Aos professores e colegas do mestrado pelas valiosas discussões em sala que muito contribuíram para o meu conhecimento.

A Capes e CNPq, pelo apoio financeiro.

A FINEP, pelo fornecimento do aparelho de PCR em tempo real.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

São os experimentos que têm a última palavra, não as teorias, por mais elegantes que elas sejam. Ao cientista cabe a humildade de aceitar a limitação de suas teorias e hipóteses perante a criatividade da natureza. E o orgulho de poder decifrá-la mesmo que através de caminhos tortuosos.

Marcelo Gleiser

CARNEIRO, J L V. **Níveis plasmáticos do malondialdeído e expressão do RNAm CXCR4 em células do sangue periférico de pacientes com câncer de mama.** 2008. 109f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

O câncer de mama é uma das neoplasias malignas mais comuns em mulheres e é responsável por uma grande parcela de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. O malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, encontra-se elevado no plasma de pacientes com câncer de mama. As quimiocinas e seus receptores estão envolvidos no controle do direcionamento dos linfócitos, mecanismo essencial do sistema imunológico. O receptor de quimiocina CXCR4 pode estar envolvido no desenvolvimento de uma variedade de patologias como o câncer de mama. No presente estudo, foram avaliados níveis de MDA e expressão de CXCR4 no sangue periférico nos diferentes estadiamentos do câncer de mama, além disso, foram avaliados o perfil etário das pacientes, sua distribuição nos diferentes estadiamentos da doença, bem como a distribuição dos tipos de carcinoma. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de 59 pacientes com câncer de mama entre 31-76 anos e 84 doadoras de sangue saudáveis acima dos 25 anos de idade. Das pacientes estudadas, 74% apresentou idade superior aos 45 anos. Em relação ao estadiamento, observou-se maior número de pacientes no estágio II da doença (49.1%), seguido do estágio III (42.4%), estágio IV (5.1%) e estágio I (3.4%). A análise dos tipos de carcinoma nas pacientes mostrou que 93.2% dos carcinomas eram do tipo ductal invasor, enquanto 3.4% eram do tipo lobular invasor e 3.4% não foram identificados. O nível de MDA no grupo controle foi 0.34 ± 0.03 $\mu\text{mol/L}$ e no grupo de pacientes com câncer foi 1.41 ± 0.11 $\mu\text{mol/L}$ apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$). Nos estágios I, II, III, IV, os níveis de MDA foram 0.78 ± 0.07 , 1.54 ± 0.17 , 1.35 ± 0.16 , 1.05 ± 0.37 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Verificou-se que os níveis de MDA nos estágios II e III foram significativamente maiores que no controle ($p < 0.0001$) e que nos estágios I e IV o nível de MDA foi significativamente inferior ao grupo total de câncer ($p < 0.05$). Em relação à expressão do CXCR4, demonstrou-se que ela estava aumentada no grupo com câncer em relação ao grupo controle, 3.87 ± 1.05 e 2.76 ± 0.65 , respectivamente, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, a expressão do CXCR4 nos estágios I, II, III e IV foi de 0.83 ± 0.43 , 5.95 ± 2.05 , 1.77 ± 0.44 e 1.4 ± 0.25 , respectivamente, sendo que somente o estágio II apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$). Uma vez que os maiores níveis de MDA e de expressão de CXCR4 estavam presentes nas pacientes pertencentes ao estadiamento II da doença, pode-se sugerir que o aumento do MDA no plasma poderia estar relacionado com a expressão aumentada de CXCR4 em células do sangue periférico de pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Malondialdeído. CXCR4.

CARNEIRO, J L V. **Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 mRNA expression in peripheral blood cells of breast cancer patients.** 2008. 109p. Dissertation (Master degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common neoplasms in women and is a leading cause of cancer related deaths worldwide. Malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, has been shown to be increased in plasma of breast cancer patients. Chemokines and their receptors are involved in controlling lymphocyte trafficking, which is a critical component of systemic immunity. CXCR4 chemokine receptor might be involved in the development of variety disease such as breast cancer. This study examined the plasma MDA and expression of CXCR4 mRNA in peripheral blood cells from healthy donors and patients in different stages of breast cancer. Furthermore, patients age, stages of the disease, and carcinoma types were analyzed. Samples were collected from 59 breast cancer patients aged between 31-73 years and 84 healthy blood donors over 25 years of age. Of patients, 74% were over 45 years of age. The majority were in stage II (49.1%), followed of stage III (42.4%), stage IV (5.1%) and stage I (3.4%). The analysis of carcinoma types showed that 93.2% were invasive ductal carcinoma, 3.4% were invasive lobular carcinoma and 3.4% were not identified. MDA concentrations in control group was 0.34 ± 0.03 and in breast cancer group was 1.41 ± 0.11 showing significant statistical difference ($p < 0.0001$). In stages I,II,III and IV, MDA levels were 0.78 ± 0.07 , 1.54 ± 0.17 , 1.35 ± 0.16 , 1.05 ± 0.37 , respectively. A significant increase of MDA concentrations was observed in stage II and III compared with control group ($p < 0.0001$) and significant decrease was observed in stages I and IV compared with total breast cancer group ($p < 0.05$). There was no statistical significance of CXCR4 expression in peripheral blood cells from breast cancer patients (3.87 ± 1.05) and control group (2.76 ± 0.65). In stages I,II,III and IV, CXCR4 expression was 0.83 ± 0.43 , 5.95 ± 2.05 , 1.77 ± 0.44 e 1.4 ± 0.25 , respectively, the samples of stage II differ statistically when compared with control group ($p < 0.05$). Since, high MDA levels and CXCR4 expression was observed in stage II of breast cancer patients, plasma MDA may play a critical role in increase of CXCR4 RNAm in peripheral blood cells of breast cancer patients.

Keywords: Breast cancer. Malondialdehyde. CXCR4.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Tipos de cânceres mais incidentes estimados para o ano de 2008 na população brasileira, excluindo câncer de pele do tipo não Melanoma16
- Figura 2** – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação18
- Figura 3** – Números de novos casos e taxas de incidência por idade, por sexo, câncer de mama, UK 200419
- Figura 4** – A via da lipoperoxidação24
- Figura 5** – Nomenclatura usual e nova nomenclatura para as quimiocinas e seus receptores28
- Figura 6** – Perfil etário das mulheres com câncer de mama51
- Figura 7** – Distribuição das pacientes nos diferentes estadiamentos do câncer de mama52
- Figura 8** – Distribuição dos tipos de carcinoma mamário nas pacientes54
- Figura 9** – Cromatograma de uma amostra de plasma de uma paciente com câncer de mama57
- Figura 10** – Concentração de MDA no plasma de doadores saudáveis (Controle) e de pacientes com câncer de mama (Câncer)57
- Figura 11** – Concentração de MDA no plasma de doadores saudáveis (Controle) pacientes com câncer de mama (Câncer) e pacientes com câncer de mama distribuídas nos estágios I, II, III e IV58
- Figura 12** – Expressão do RNAm de β -actina em células do sangue periférico61
- Figura 13** – Determinação da concentração de DNAc62
- Figura 14** – Perfil da chuva de *melting* realizada após amplificação de um fragmento do gene CXCR4 por PCR em tempo real63
- Figura 15** – Expressão do RNAm do CXCR4 em células do sangue periférico de doadoras saudáveis (Controle) e em pacientes com câncer de mama (Câncer)64

Figura 16 – Expressão do RNAm do CXCR4 em células do sangue periférico de doadoras saudáveis (Controle), em pacientes com câncer de mama (Câncer) e pacientes com câncer de mama distribuídas de acordo com os estágios I, II, III e IV.....65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AGPI** – Ácidos Graxos Poliinsaturados
- BHT** – 2,6-di-terc-butil-p-hidroxitolueno
- CDI** – Carcinoma Ductal Invasor
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLI** – Carcinoma Lobular Invasor
- CT** – Cycle Threshold
- CXCL12** – Quimiocina da família CXC
- CXCR4** – Receptor da quimiocina CXCL12
- DNA** – Ácido desoxiribonucléico
- DNAc** – Ácido desoxiribonucléico complementar
- DNPH** – 2,4-dinitrofenilhidrazina
- DTC** – Disseminated tumor cells
- EPC** – Endothelial progenitor cells
- GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- LPC** – Lisofosfatidilcolina
- MCP-1** – Proteína quimiotática de monócitos
- MDA** – Malondialdeído
- MIP-1 α** – Proteína inflamatória de macrófagos
- NF-kappa B** – Fator de transcrição
- NO** – Óxido nítrico
- PBMC** – Células mononucleares do sangue periférico
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- RL** – Radicais Livres
- RNA** – Ácido ribonucléico
- RNAm** – Ácido ribonucléico mensageiro
- RNS** – Substâncias reativas do nitrogênio
- ROI** – Intermediários reativos do oxigênio
- ROS** – Substâncias reativas do oxigênio
- RT** – Reação de Transcrição Reversa
- TBA** – Ácido tiobarbitúrico
- TBARS** – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TEP – 1,1,3,3-tetraetoxipropano

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	15
1.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER DE MAMA.....	17
1.3 CÂNCER DE MAMA E MALONDIALDEÍDO	23
1.4 QUIMIOCINAS.....	26
1.5 QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4.....	29
1.6 CXCR4, CÂNCER DE MAMA E METÁSTASES	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA SEGUNDO UICC.....	36
3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	40
3.3 ANÁLISE MOLECULAR.....	42
3.3.1 Obtenção de Leucócitos para Extração de RNA.....	42
3.3.2 Quantificação das Amostras de RNA	42
3.3.3 Síntese de DNAc.....	43
3.3.4 Quantificação das Amostras de DNAc	43
3.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase – β -actina	44
3.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT – PCR) – GAPDH	46
3.3.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT – PCR) – CXCR4.....	47
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 IDADE	51
4.2 ESTADIAMENTO	52
4.3 TIPOS DE CARCINOMA.....	53
4.4 ANÁLISE DO MDA	55
4.5 ANÁLISE MOLECULAR.....	61
4.5.1 Integridade do RNA.....	61

4.5.2 Determinação da Quantidade de DNAc	62
4.5.3 Análise da Expressão do RNAm do CXCR4	63
5 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O câncer é caracterizado pela expansão clonal descontrolada de uma ou mais células as quais possuem acúmulo de alterações genéticas resultando na desregulação da proliferação celular, seleção e formação do tumor.

A maioria dos cânceres pode ser decorrente de alterações genéticas relacionadas a fatores ambientais e outros fatores como comportamento, estilo de vida, dieta, alterações na vida reprodutiva, possível exposição à radiação, vírus e substâncias carcinogênicas.

É inquestionável a importância mundial do câncer uma vez que é a segunda maior causa de mortes no mundo (INCA/MS, 2007) ficando atrás somente de doenças cardiovasculares. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes (WHO, 2006). A incidência tem aumentado tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento como resultado da crescente exposição a fatores de risco e do aumento da expectativa de vida. Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões (INCA/MS, 2007).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer. Como mostrado na figura 1, os tipos de câncer mais incidentes, excluindo câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata (49.530) e de pulmão (17.810), no sexo masculino, e os cânceres de mama (49.400) e de colo do útero (18.680), no sexo feminino, acompanhando o perfil observado no mundo (INCA/MS, 2007).

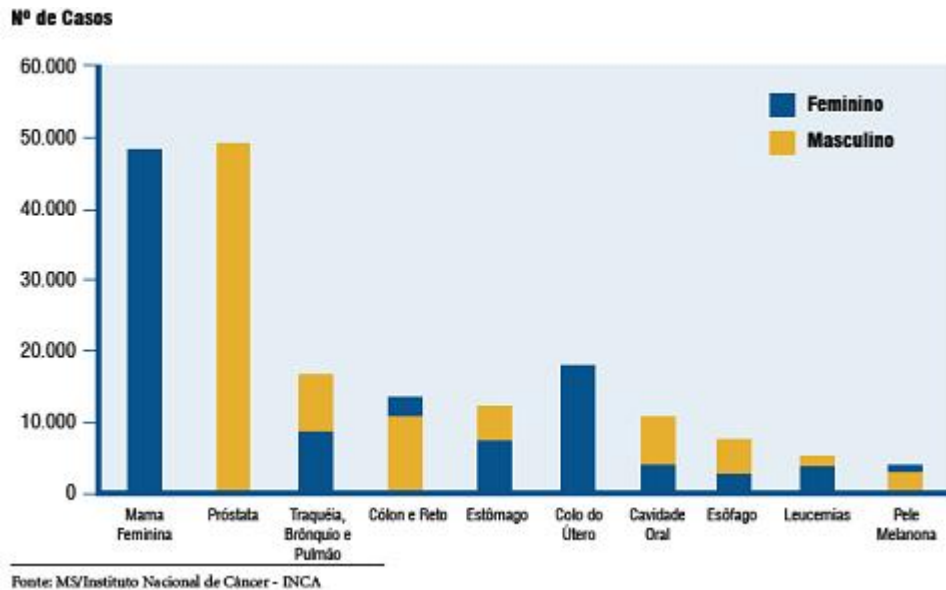


Figura 1 – Tipos de cânceres mais incidentes estimados para o ano de 2008 na população brasileira, excluindo câncer de pele do tipo não melanoma.

A iniciação do câncer ocorre devido a modificações genéticas e/ou epigenéticas de uma ou mais células. A subsequente progressão tumoral é conseqüência do acúmulo de alterações genéticas em genes reguladores do crescimento e diferenciação celular que, geralmente, resulta na expansão clonal e seleção dessas células (POLYAK, 2007).

As alterações genéticas relacionadas com o desenvolvimento do câncer envolvem principalmente a expressão aumentada de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores tumorais, instabilidades cromossômicas, alterações nos genes de reparo do DNA, reativação da telomerase e alterações epigenéticas (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; RODENHISER; MANN, 2006).

Os oncogenes originam-se de mutações em proto-oncogenes (genes de células normais). Com as mutações, os oncogenes adquirem uma nova função e geralmente possuem sua atividade aumentada. Os proto-oncogenes estão envolvidos em processos celulares importantes, tais como modulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular.

As alterações epigenéticas representam um mecanismo importante no desenvolvimento de vários tipos de câncer por alterar a expressão de genes críticos, podendo resultar na expressão aumentada de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores tumorais (RODENHISER; MANN, 2006). O termo epigenética

refere-se a todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Existem três mecanismos principais de alterações epigenéticas: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores. Os padrões de metilação de DNA são os mais estudados e melhor entendidos dentre estes mecanismos, embora modificações de histonas também sejam bastante discutidas.

A carcinogênese representa um processo em etapas, envolvendo pelo menos quatro a sete alterações genéticas. Isso explica porque o câncer pode se desenvolver anos após exposição a carcinógenos e a sua incidência aumenta com a idade, estando associado ao envelhecimento (VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

1.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença complexa, heterogênea, cuja evolução depende da interação tumor-hospedeiro e tem início quando as células mamárias começam a crescer descontroladamente, podendo assim invadir tecidos próximos ou distantes (metástase). A invasão de tecidos é o resultado de diversas etapas, e representa um processo não randômico, órgão seletivo e altamente organizado.

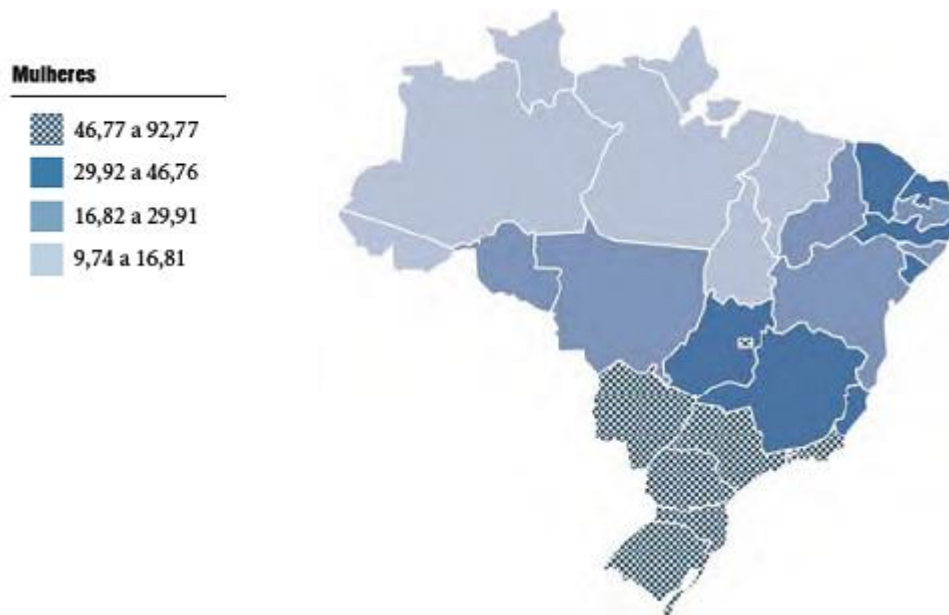
O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA/MS, 2007). É a maior causa de morte por câncer na população feminina no mundo (KALEMKERIAN et al., 2006).

A distribuição geográfica do tumor de mama é muito variada, pois fatores como idade, paridade e nível de desenvolvimento do país interferem na ocorrência. Sugere-se que o ambiente e/ou estilo de vida influenciam na incidência da doença (INCA/MS, 2007). Além disso, sabe-se que regiões mais desenvolvidas apresentam um aumento da taxa de incidência e de mortalidade por câncer de mama por apresentarem melhores procedimentos diagnósticos e melhores informações em atestados de óbitos.

No Brasil o número de casos novos de câncer de mama esperados para o ano de 2008, é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2007).

As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas (figura 2), enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário.

Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sul (67/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (28/100.000). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (16/100.000). Para o Estado do Paraná, que é um dos estados onde há maior incidência do câncer de mama, as estimativas para o ano de 2008 são de 3010 novos casos, sendo 700 apenas na cidade de Curitiba (INCA/MS, 2007).

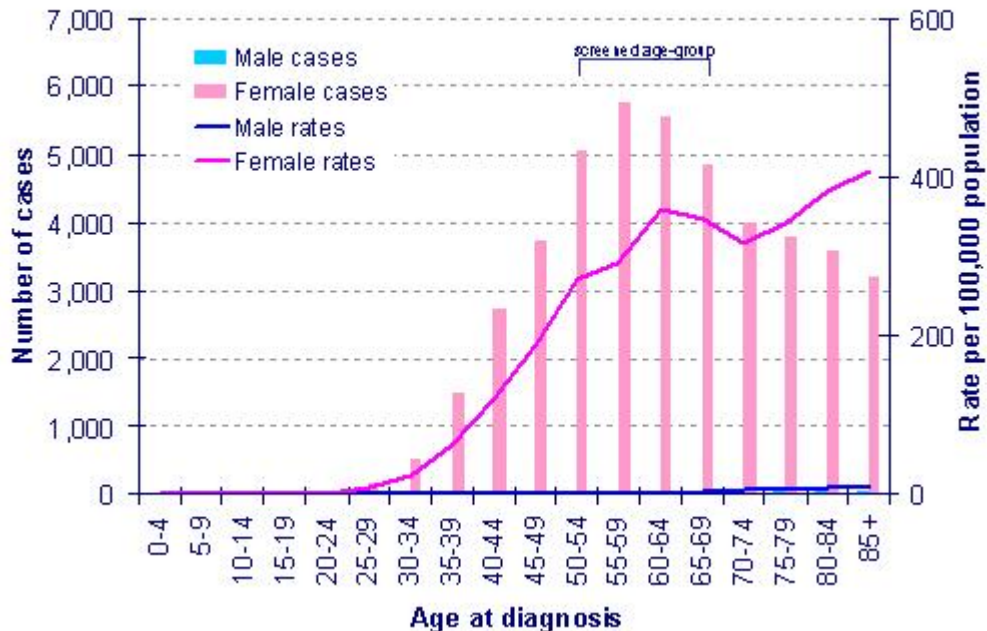


Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA

Figura 2 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da mama feminina por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação.

O risco de ocorrência do câncer de mama está fortemente relacionado com a idade, sendo que mais de 80% dos casos ocorrem em mulheres

acima dos 50 anos de idade (CANCER RESEARCH UK, 2004), conforme mostrado na figura 3.



Fonte: Cancer Research UK.

Figura 3. Números de novos casos e taxas de incidência por idade, por sexo, câncer de mama, UK 2004.

Estudos evidenciam a existência de genes cujas alterações estão relacionadas ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama. Mutações nos genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* predis põem mulheres ao câncer de mama e ovário. Portadoras de mutações hereditárias em *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam risco de câncer de mama superior a 80% (FRIEDENSON, 2005). Um histórico de câncer de mama em membros próximos da família é um fator de risco importante, particularmente se o câncer ocorreu em uma idade precoce.

Aproximadamente 5 a 10% dos cânceres de mama são atribuídos a fatores genéticos hereditários (ERKKO et al., 2008).

Além de fatores hereditários, estudos apontam fatores pessoais e ambientais que podem influenciar o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Esses fatores incluem sexo, idade, etnia, obesidade, hábitos alimentares, histórico hormonal e reprodutivo, bem como exposição a carcinógenos químicos e físicos.

Os principais fatores de risco para o câncer de mama estão relacionados com o histórico hormonal e reprodutivo da mulher, tais como a menarca precoce, menopausa tardia e número de filhos (LAMBE et al., 1996; GREENLEE et al., 2000).

Mulheres que têm a primeira gestação antes dos 24 anos apresentam diminuição do risco de desenvolvimento do câncer de mama, e gestações adicionais aumentam essa proteção (LAMBE et al., 1996).

O efeito protetor da gestação foi demonstrado em experimentos com roedores através da administração de carcinógenos que são conhecidos por induzir tumores na glândula mamária de ratas. A administração da droga em ratas nulíparas provoca o desenvolvimento de tumores na mama desses animais, mas o mesmo carcinógeno não induz tumores em ratas que já tiveram uma gestação completa (TAY; RUSSO, 1981).

A alta susceptibilidade de ratas nulíparas em desenvolver tumores é resultado da interação do carcinógeno com as células que estão rapidamente se dividindo e possuem baixa capacidade de sistemas de reparo do DNA nas estruturas indiferenciadas da glândula mamária (RUSSO; RUSSO, 1997).

Estas observações sugerem que os danos no DNA causados pela radiação, carcinógenos ambientais, desequilíbrios hormonais, agindo isoladamente ou em combinação com predisposição genética, induzem o desenvolvimento do câncer de mama pela interação com as estruturas não diferenciadas na glândula mamária (RUSSO et al., 1982). Essa combinação multifatorial acontece durante o período de alta susceptibilidade que vai desde a menarca até a primeira gravidez da mulher, mesmo que as células danificadas sejam detectadas clinicamente depois de muitos anos da exposição ao carcinógeno e após vários estádios de transformação maligna (RUSSO et al., 2005).

O risco para o desenvolvimento do câncer de mama também é maior em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média) (PARKIN et al., 2001).

Além de ser um ativador da proliferação das células do tecido mamário, acredita-se que o estrogênio possua um efeito anti-apoptótico, impedindo a morte programada das células que sofreram danos no DNA e conseqüentemente em genes importantes que controlam o ciclo celular (NAROD; FOULKES, 2004).

Em relação ao uso de contraceptivos orais e o risco de câncer de mama, muitos estudos demonstram que certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam contraceptivos orais com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo, têm maior risco (PARKIN et al., 2001). kahlenborn et al. (2006) realizaram uma meta-análise com 34 trabalhos de 17 países, entre eles o Brasil, que relacionam o uso de contraceptivos orais e o risco de câncer de mama. Os resultados dessa meta-análise sugerem que o uso dos contraceptivos orais está associado com o aumento do risco de câncer de mama entre mulheres pré-menopausa ou com idade superior a 50 anos. O risco parece ser maior para mulheres que fazem uso da pílula antes da primeira gravidez. Estudos também demonstram que o risco diminui logo após o término do uso atingindo os parâmetros normais de risco em dez anos. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os contraceptivos orais e as terapias de reposição hormonal como carcinógenos do grupo 1, ou seja, agentes causadores de câncer em seres humanos (IARC, 2005).

Outros fatores que, embora controversos, parecem aumentar o risco de câncer de mama são a ingestão de dieta gordurosa e o consumo elevado de álcool (PARKIN et al., 2001). Mulheres com uma mutação no gene *BRCA1* têm probabilidade 65% menor de desenvolver a doença se perderem peso entre os 18 e 30 anos de idade (KOTSOPOULOS et al., 2005). O estudo também mostra que portadoras da mutação *BRCA1* que ganharam 5 kg ou mais entre os 18 e 30 anos, possuem um risco 44% maior de desenvolver câncer de mama se elas tiverem 2 filhos ou mais. A obesidade está relacionada com um maior risco em mulheres pós-menopausa (CARVALHEIRA; SAAD, 2006). Alguns trabalhos sugerem que o consumo de vitamina A, frutas e vegetais podem reduzir o risco de desenvolver a doença (CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

Estudos recentes evidenciam forte envolvimento de algumas populações de células cancerígenas de um tumor que são realmente tumorigênicas (LIU et al., 2007). Liu et al. (2007) mostraram que, em câncer de mama, uma pequena população de células cancerígenas, caracterizada pela expressão de CD44 e baixa ou indetectável expressão de CD24 (CD44+CD24-/baixa), possui alta capacidade tumorigênica quando injetada em camundongos imunodeficientes. O restante das células cancerígenas chamadas não-tumorigênicas possui pequena ou nenhuma habilidade. A população CD44+CD24-/baixa divide com células-tronco

normais a capacidade para se alto renovar (LIU et al., 2007). As implicações clínicas com essas descobertas são substanciais uma vez que células tumorigênicas de câncer de mama podem ter alto potencial de invadir e metastizar (LIU et al., 2007).

A metástase é frequentemente a fase final de tumores malignos. O processo de metástase se caracteriza pela invasão da corrente sanguínea por células tumorais e sua disseminação em órgãos distantes (CHAMBERS et al., 2002).

Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o sítio de origem da neoplasia, dividindo-se em ductais e lobulares. Os ductais se desenvolvem nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores. Os lobulares desenvolvem no interior dos lóbulos e representam cerca de 10 a 15% dos casos. Outros subtipos raros representam menos de 10% dos casos diagnosticados por ano (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). As pacientes com carcinoma ductal invasivo apresentam maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que aquele verificado nas pacientes com tipos menos freqüentes de carcinoma invasivo de mama (KETTERHAGEN et al., 1984).

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação histológica são classificações bastante utilizadas na clínica e são importantes na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de classificação dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, que considera as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases a distância. A avaliação desses parâmetros permite a determinação do estadiamento que varia dos estágios I ao IV (SOBIN; WITTEKIND, 2002).

O conhecimento sobre os diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado por pesquisadores desta área, mas o grande desafio da oncologia tem sido o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem o câncer.

O câncer de mama é uma doença que apresenta variações genéticas, moleculares e histopatológicas que podem resultar em diferentes respostas clínicas (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). Dessa forma o entendimento da biologia do câncer de mama e dos mecanismos que regulam os processos de iniciação e progressão tumoral, além da busca por marcadores moleculares são importantes para o desenvolvimento de melhores procedimentos diagnósticos com repercussões terapêuticas e prognósticas.

1.3 CÂNCER DE MAMA E MALONDIALDEÍDO

Efeitos tóxicos sobre as células podem ocorrer a partir da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por substâncias reativas de oxigênio (ROS) e substâncias reativas de nitrogênio (RNS), conhecidas genericamente como radicais livres (GILLER; SINGLER, 1995; ROMERO et al., 1998).

Os radicais livres são capazes de alterar as principais classes de biomoléculas, tais como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas, causando mudanças na sua estrutura e função (GUYTON; KENSLER, 1993). Os radicais livres estão relacionados com uma variedade de doenças incluindo o câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento (ESTERBAUER et al., 1992; CHIRICO et al., 1993; MORIEL et al., 1999; CHISOLM; STEINBERG, 2000). Os primeiros alvos de radicais livres são ácidos graxos poliinsaturados em membranas celulares e sua interação resulta em peroxidação lipídica. Alterações na peroxidação lipídica têm sido descritas em pacientes com câncer de mama (HUANG et al., 1999; KHANZODE et al., 2004; GÖNENÇ et al., 2001).

A lipoperoxidação talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia uma seqüência de lesões na célula. As modificações nas membranas levam a alterações na permeabilidade e no fluxo iônico e o de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (VACA et al., 1988; BARBER; HARRIS, 1994). O processo de lipoperoxidação é uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais alquila (L°), alcóxila (LO°) e peróxila (LOO°), levando a destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). A lipoperoxidação consiste basicamente na incorporação de oxigênio molecular a um AGPI para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial (figura 4). Nos sistemas biológicos a lipoperoxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: via

enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação de AGPI, e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ROS, RNS, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHDI et al., 1993; PORTER et al., 1995).

Os produtos formados a partir da peroxidação lipídica são hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos (Figura 4), que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar estresse oxidativo. Estes produtos podem causar danos a macromoléculas incluindo o DNA e têm sido implicados em muitos processos patológicos como o câncer. Muitos estudos têm examinado a possibilidade da relação entre peroxidação lipídica e câncer (TORUN et al., 1995).



Fonte: MARNETT, 1999 (com algumas modificações).

Figura 4 – A via da lipoperoxidação.

As principais metodologias utilizadas para avaliação da lipoperoxidação em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar o estresse oxidativo é o teste do malondialdeído (MDA).

O malondialdeído é um dos produtos finais da peroxidação lipídica (GÖNENÇ et al., 2001), e é também formado como produto da reação da ciclooxigenase no metabolismo das prostaglandinas.

Nos últimos anos o MDA tem sido considerado como o principal indicador do processo lipoperoxidativo (GAWE et al., 2004) e por isso tem sido alvo de muitos estudos como indicador do estresse oxidativo (DEL RIO; STEWART et al., 2005) e precursor de desordens endoteliais (POLIDORI et al., 2002). Ele presente no plasma humano e possui propriedades biológicas que podem ser relevantes para a carcinogênese.

Sener et al. (2007) mostraram que a baixa capacidade antioxidante total e altos níveis de malondialdeído (MDA), além do estresse oxidativo, podem estar relacionados com o câncer de mama. Tem sido demonstrado que a lisofosfatidilcolina (LPC) é o principal fosfolípide constituinte da LDL oxidada, estado em que as lipoproteínas se encontram modificadas devido a alterações oxidativas como o estresse oxidativo (PALINSKI et al., 1989; ROSS, 1993). Demonstraram que a LPC aumenta os níveis de expressão do receptor CXCR4 em células T CD4 humanas (HAN et al. 2004). A regulação da expressão do CXCR4m depende da ativação celular, do tipo celular e do estresse oxidativo (CARUZ et al., 1998; SACCANI et al., 2000).

Em matrizes biológicas o malondialdeído existe tanto na forma livre como na forma ligada a grupos SH e NH₂ de macromoléculas, proteínas e ácidos nucléicos (ESTERBAUER et al., 1991; CARBONNEAU et al., 1991; CIGHETTI et al., 1999). Em amostras biológicas somente pequenas quantidades de MDA livre estão presentes e sua dosagem é difícil devido ao baixo limite de detecção do método usado (CARBONNEAU et al., 1991; KAWAI et al., 1989; LARGILLIERE; MELANCON, 1988).

MDA e aldeídos em geral podem ser determinados por uma variedade de métodos. Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

MDA é mais frequentemente avaliado por espectrofotômetro como substância reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Porém, existem desvantagens

nessa técnica, uma vez que o ensaio do ácido tiobarbitúrico não é específico para o MDA (ESTERBAUER et al., 1991; HALLIWELL; CHIRICO, 1993; JANERO, 1990).

Além do espectrofotômetro, existe uma variedade de outros sistemas de detecção utilizados para a identificação do MDA como: procedimentos fluorimétricos, cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ou não à espectrometria de massas.

1.4 QUIMIOCINAS

Poucos campos de estudo da biologia molecular sofreram revolução tão acentuada quanto o campo das quimiocinas. A primeira molécula descrita como potente quimioatraente para neutrófilos, conhecida como IL-8, foi clonada na década de 90 (WOLPE et al., 1988; WADA et al., 1994).

A primeira quimiocina descrita e clonada foi a IL-8 (CXCL8) (WALZ et al., 1987; WADA et al., 1994). A IL-6 foi identificada inicialmente como uma molécula quimioatraente para neutrófilos (WOLPE et al., 1988). Desde as décadas de 60-70, foram caracterizadas mais de 50 quimiocinas humanas e muitos homólogos em murinos. O termo quimiocina foi aplicado a estas moléculas, pois se acreditava que sua principal atividade biológica era de quimiotaxia, ou seja, direcionar o movimento de outras células durante os processos inflamatórios. Posteriormente tornou-se evidente que seus efeitos estendem-se muito além de atrair leucócitos aos sítios de inflamação. Evidências indicam que as quimiocinas participam no desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na recirculação dos leucócitos e na regulação imunológica (LUSTER et al., 1995; YOSHIMURA et al., 1987; WALZ et al., 1989; BAGGIOLINI et al., 1994; SARAFI et al., 1997; LUSTER, 1998; CHENSUE; STEPHEN, 2001).

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas com função de mensageiros intercelulares, as quais carregam sinais regulatórios de célula para célula. Produzidas por vários tipos celulares, tanto constitutivamente quanto após indução, exerce seus efeitos de maneira autócrina ou parácrina (BAGGIOLINI, 2001). Estão presentes principalmente em processos inflamatórios, onde a presença de leucócitos

é essencial na resposta do hospedeiro durante o processo infeccioso. As quimiocinas, entretanto, são muito menores que as citocinas e agem via receptores em heptahélice acoplados à proteína G (BAGGIOLINI, 2001).

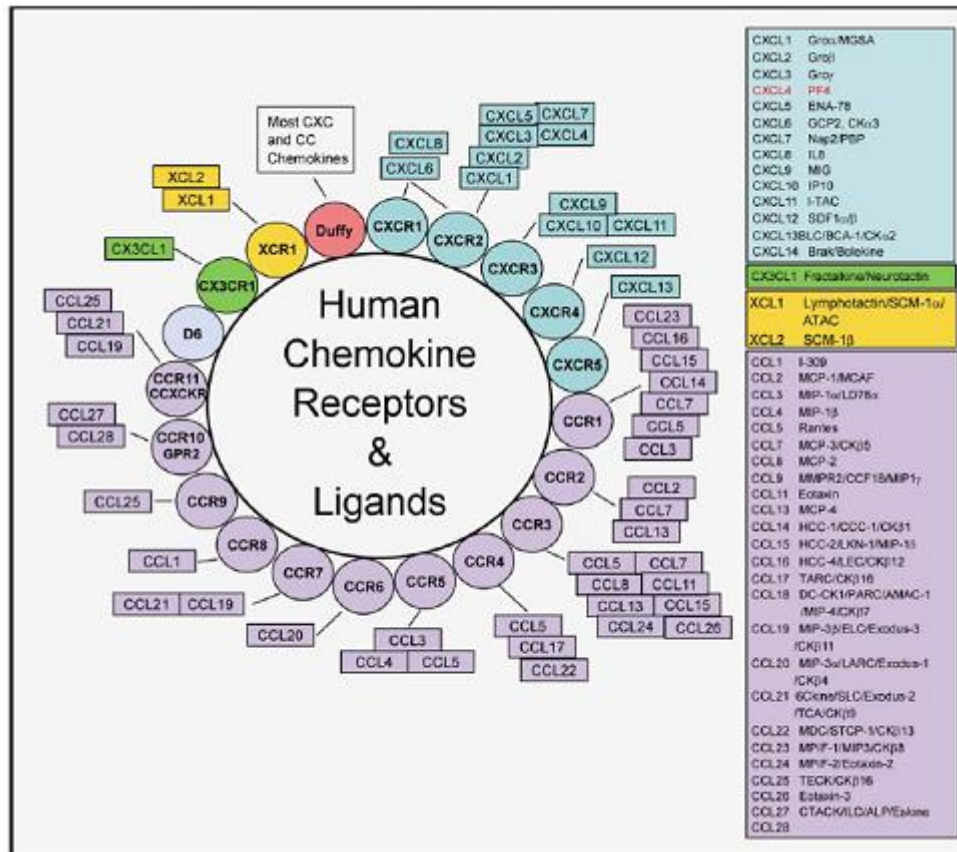
Consistem de uma grande família de pequenas moléculas (~8-14kDa) estruturalmente relacionadas e descritas como citocinas quimioatraentes, que regulam muitos aspectos da migração e do tráfego leucocitário, tendo importantes funções no desenvolvimento imunológico e hematopoiético (PELUS et al., 2002).

A estrutura das quimiocinas consiste de aproximadamente 70-130 aminoácidos, com quatro cisteínas conservadas. Como proteínas secretadas elas são sintetizadas com uma seqüência líder de 20-25 aminoácidos, que é clivada antes da liberação da quimiocina (BAGGIOLINI, 2001). Elas podem ser classificadas em quatro famílias (CXC, CC, CX₃C e XC) baseadas tanto na posição quanto no número de resíduos de cisteína amino-terminais (PELUS et al., 2002).

Para cada família de quimiocinas descrita, existem receptores respectivos, acoplados à proteína G e que estarão mediando suas funções junto às células-alvo. Inicialmente, quando estas proteínas foram identificadas, apesar de não se conhecer as atividades biológicas, sabia-se que estavam associadas com doenças inflamatórias (BAGGIOLINI, 2001).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores tornou-se necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX₃C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene (PELUS et al., 2002).

Um sumário das quimiocinas humanas e de seus receptores está mostrado na figura 5.



Fonte: Pelus et al., 2002.

Figura 5 – Nomenclatura usual e nova nomenclatura para as quimiocinas e seus receptores.

Virtualmente, cada tecido e tipo celular residente podem ser induzidos a secretar quimiocinas. Enquanto determinadas células, como os macrófagos podem produzir uma variedade de quimiocinas, há tecidos que exibem uma produção restrita, sugerindo que algumas quimiocinas têm funções órgão-específicas (CHENSUE; STEPHEN, 2001).

As quimiocinas, dentre outras funções, são responsáveis pelo controle da homeostasia. A contínua recirculação de linfócitos pelo sangue, tecidos e vasos linfáticos ocorre de maneira organizada. Linfócitos imaturos são levados aos linfonodos a fim de que eles encontrem diferentes antígenos e se transformem em linfócitos de memória. Os macrófagos, eosinófilos e mastócitos também migram para os tecidos seguindo sinais quimiotáticos.

Ultimamente têm-se discutido o papel das quimiocinas e o seu envolvimento nas neoplasias. O fator-1 derivado do estroma da medula óssea (SDF-1/CXCL12) que, através do seu receptor (CXCR4), desenvolve importantes funções

na migração, retenção e desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos na medula óssea. Além disso, o sistema CXCL12/CXCR4 está envolvido na quimiotaxia de células cancerosas e na metástase tumoral (KANG et al., 2005).

1.5 QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4

A CXCL12, também conhecida como SDF-1 e pertencente à família CXC (alfa-quimiocina), foi inicialmente descrita como um fator derivado de células do estroma da medula óssea, e um fator pré-estimulador de células B (NAGASAWA et al., 1996). É uma quimiocina constitutivamente expressa por células do estroma medular e em outros tecidos epiteliais normais. Inúmeros estudos sugerem que esta quimiocina desenvolve um papel chave no *homing* de células tronco e de células progenitoras hematopoiéticas atuando como um modulador do crescimento e da sobrevivência celular (AIUTI et al., 1997). É um potente quimioatraente para vários tipos celulares, que apresentem o receptor CXCR4 acoplado a proteína G em sua superfície (GERLI et al., 2005).

O CXCR4 é o único receptor conhecido para CXCL12. A ligação desta quimiocina com seu receptor exibe efeito quimiotático para leucócitos *in vitro*, tendo uma alta capacidade quimioatraente *in vivo* (MA et al., 1998).

O seqüenciamento da quimiocina CXCL12 (GenBank: L36033) revelou um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não traduzida (3'UTR), (posição 801 G → A) do gene estrutural transcrito. Este polimorfismo, designado SDF1-3'A está presente no SDF-1 β , mas não no transcrito SDF-1 α . Este alelo variante pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de CXCL12 (WINKLER et al., 1998). Vários estudos têm avaliado a frequência genotípica do alelo SDF1-3'A em diferentes populações e diferentes condições patológicas, com o objetivo de observar as possíveis implicações deste polimorfismo na susceptibilidade a doenças (BENBOUBKER et al., 2001; SCHROPPEL et al., 2002). A associação entre o polimorfismo genético da CXCL12 tem sido amplamente investigada quanto à resistência a infecção pelo HIV e a progressão da AIDS (TIENSIWAKUL et al., 2004; WATANABE et al., 2003). Cavassin et al. (2004) verificaram que pacientes com linfoma apresentam maior

prevalência do alelo mutado, em comparação aos pacientes com leucemia linfóide, sugerindo um papel no comportamento clínico e biológico desses pacientes.

Razmkhah et al. (2005) avaliaram a susceptibilidade de mulheres iranianas ao câncer de mama, em relação ao polimorfismo SDF1-3'A, e observaram uma maior frequência do alelo 3'A em mulheres com o tumor do que no grupo controle, sugerindo desta forma que o possível aumento na produção de CXCL12 pelos portadores do alelo mutado, pode provocar um desequilíbrio na regulação do ciclo celular levando a transformação celular e subsequente formação do tumor.

1.6 CXCR4, CÂNCER DE MAMA E METÁSTASES

Recentemente verificou-se que células tumorais como, por exemplo, células do tumor de mama, podem ser guiadas através da circulação sanguínea até órgãos distantes que expressam quimiocinas específicas como a CXCL12, pois estas células possuem receptores específicos que possibilitam este evento. As células tumorais invadem estes órgãos e possibilitando a origem de tumores secundários (MULLER et al., 2001).

Receptores de quimiocinas desempenham papéis relevantes no desenvolvimento da metástase, facilitando a disseminação tumoral em cada um dos eventos do processo, incluindo aderência das células tumorais ao endotélio, extravasamento para os vasos sanguíneos, colonização metastática, angiogênese, proliferação e proteção contra resposta do hospedeiro através da ativação de vias de sobrevivência celular. Após crescimento inicial de tumores primários células malignas invadem os vasos sanguíneos, e as células tumorais circulantes podem ficar presas em vasos menores devido ao seu tamanho, bem como por eventos mais específicos mediados por receptores, migrando então para tecidos distantes (SINGH et al., 2007; KAKINUMA; HWANG, 2006).

O câncer de mama é caracterizado por um padrão metastático distinto, envolvendo linfonodos, medula óssea, fígado e pulmão. A migração das células tumorais e metastáticas tem muita semelhança com o tráfego de leucócitos, que é regulado por quimiocinas e seus receptores (MULLER et al., 2001).

A fim de determinar se as interações das quimiocinas e seus receptores estão envolvidos em processos metastáticos, Muller et al. (2001) também realizaram análises quantitativas da expressão de receptores de quimiocinas bem conhecidos (CCR1 a CCR10, CXCR1 a CXCR5, XCR1 e CX3CR1) em sete linhagens de câncer de mama humano e compararam com a expressão de linhagens de células epiteliais mamárias normais. Foi observado aumento significativo da expressão de CXCR4 na superfície de linhagens celulares de câncer de mama, o dado foi confirmado pela análise por citometria de fluxo e também pela análise quantitativa da expressão de RNAm de CCR7 e CXCR4. O receptor de quimiocina CCR7 é particularmente expresso em tecidos linfóides e quando há ativação de linfócitos B e T (FORSTER et al., 1999). Tem sido mostrado que o CCR7 pode controlar a migração de células T de memória para tecidos com inflamação, bem como, estimular a maturação de células dendríticas (OHL et al., 2004). Foi observado que o RNAm tanto do CCR7 como do CXCR4 estavam significativamente mais expressos em tumores de mama primários quando comparado com tecido glandular mamário normal (MULLER et al., 2001).

Através da análise da expressão de CXCR4 em cortes de tecido glandular mamário normal e de carcinoma ductal invasivo por imunohistoquímica, foram observados níveis elevados de expressão de CXCR4 em células neoplásicas, em comparação com células normais (SCHMID et al., 2004). Apesar da existência de dados que mostrem que RNAm de CXCL12 é expresso em diferentes tecidos (TASHIRO et al., 1993), análises quantitativas da expressão de CXCL12 em vários órgãos mostraram que RNAm de CXCL12 é expresso preferencialmente em linfonodos, pulmão, fígado e medula óssea, e em baixa quantidade no intestino, rins, pele, cérebro e músculo esquelético. Os órgãos que apresentam expressão elevada de CXCL12 representam os sítios mais comuns de metástase no câncer de mama. Além disso, células metastáticas de linfonodos axilares e órgãos distantes como fígado e pulmão mostraram forte expressão de CXCR4 (LUKER; LUKER, 2006).

Células de câncer de mama, que expressam CXCR4 e CCR7, potencializam a polimerização da actina, formação de pseudópodes, migração direcional e a invasão tecidual pelas células de câncer de mama. Juntamente com a distribuição distinta dos seus ligantes CXCL12 e CCL21 em órgãos que representam os principais sítios de metástase do câncer de mama, pode-se supor que a interação entre as quimiocinas e seus receptores pode desempenhar um papel crucial no

desenvolvimento de metástases no câncer de mama (MULLER et al., 2001). Além disso, as quimiocinas estão envolvidas com o crescimento tumoral, angiogênese (BELPERIO et al., 2000) e resposta imune do hospedeiro contra células neoplásicas (VICARI et al., 2000).

A CXCL12, através da interação com CXCR4, pode aumentar a sobrevivência de células-tronco malignas, bem como sua proliferação, invasão e metástase, levando a disseminação do tumor em diversos tipos de cânceres, incluindo câncer de mama, próstata, tumores cerebrais, e leucemias (LAPTEVA et al., 2005; BALKWILL, 2004; KAKINUMA; HWANG, 2006).

A expressão do CXCR4 é um marcador prognóstico em pacientes com leucemia mielóide aguda e também com câncer de mama (BURGER; KIPPS, 2006).

Células de câncer de mama expressam altos níveis de CXCR4 funcionais, que podem direcionar a quimiotaxia e respostas invasivas (MULLER et al., 2001). Altos níveis de expressão de CXCR4 em células neoplásicas estão associados com uma baixa sobrevida em pacientes com câncer de mama (LUKER; LUKER, 2006; WENDT et al., 2008). Entretanto, os eventos moleculares envolvidos na ativação deste receptor ainda não estão estabelecidos. Holland et al. (2006) analisaram a expressão e função do CXCR4 em diversas linhagens celulares, desde células epiteliais mamárias imortalizadas não transformadas até linhagens celulares altamente invasivas de câncer de mama a fim de investigar a relação entre a expressão e função do CXCR4 e o potencial invasivo de células transformadas. Este estudo sugere que a expressão de CXCR4 por células epiteliais de câncer de mama não estão correlacionadas com sua funcionalidade, mas que a expressão funcional do CXCR4 está relacionada com o potencial de invasividade destas células, e que este envolve o acoplamento de subunidades de proteína G alteradas. Foi demonstrado que, embora a expressão do CXCR4 tenha sido uniforme em todas as linhagens celulares observadas, com a mesma afinidade para seu ligante em células não transformadas, metastáticas e não metastáticas, o CXCL12 foi capaz de induzir migração, mobilização de Ca^{2+} intracelular, polimerização de actina, fosforilação de vários intermediários de sinalização intracelular, e inibição da produção de AMPc apenas em linhagens celulares altamente invasivas (MDA-MB-231, BT-549), indicando que a detecção da expressão do CXCR4 em linhagens celulares e cortes histológicos não pode ser tomada como um indicador do envolvimento do CXCR4 no

processo patológico (HOLLAND et al. 2006). Estes mesmos autores sugerem também a existência de mecanismos de regulação distintos durante a ativação do CXCR4, o qual pode ser dependente do tipo celular, hipotetizando que a função do CXCR4 é regulada por processos celulares específicos, como a diferenciação e transformação entre outros. Portanto, a expressão de CXCR4 pode não ser um marcador adequado do potencial metastático. É provável que haja um mecanismo específico para prevenir a ativação do CXCR4 em células não invasivas, o qual é potencialmente alterado durante o processo de progressão celular para fenótipo mais invasivo de metástase (HOLLAND et al. 2006).

Vias de sinalização ativadas pelo CXCL12/CXCR4 podem conferir uma vantagem de crescimento às células tumorais tanto em sítios primários como em sítios metastáticos (HELBIG et al., 2003). Tem sido proposto que células tumorais que expressam CXCR4 na superfície podem se proteger de citocinas do hospedeiro bem como de apoptose induzida por quimioterapia. A via das proteínas quinases ativadas por mitógeno pode fornecer sinais de proliferação de células tumorais que expressam CXCR4 favorecendo a metástase via NF-kappa B (HELBIG et al., 2003).

Estudos *in vivo* utilizando anticorpos anti-CXCR4 mostraram a implicação deste receptor na migração e repopulação da medula óssea de camundongos pelas *stem cells* (PELED et al., 2002). Como a expressão de CXCR4, por células de câncer de mama juntamente com CXCL12, induz a migração e invasão dessas células, tanto *in vivo* como *in vitro*, é concebível que a sua interação possa contribuir para infiltração da medula óssea por células de câncer de mama. A expressão preferencial de CXCL12 no pulmão, fígado e linfonodos também sugerem o papel dessa quimiocina no tropismo das células de câncer de mama para estes órgãos (MULLER et al., 2001).

É possível que os receptores CXCR4, entre outros, possam representar um novo alvo para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para esta doença (BURGER; KIPPS, 2002).

Constantes esforços têm sido realizados para se identificar pequenas moléculas antagonistas de vários receptores de quimiocinas. Luker e Luker (2006) verificaram que estas moléculas antagonistas dos receptores de quimiocinas, como CXCR4, podem interferir na progressão do tumor e das metástases em pacientes com câncer.

Um grande número de pequenas moléculas ou peptídeos inibitórios de receptores de quimiocinas (a maioria tendo o CXCR4 como alvo) tem apresentado efeitos sobre o crescimento tumoral em modelos animais. A utilização de antagonistas de receptores de quimiocinas no tratamento de tumores metastáticos baseia-se no fato de haver um aumento na expressão desses receptores por tumores na presença de hipóxia ou de outro estresse celular e na dependência destes receptores para a sobrevivência. Uma vez ativados, protegem as células tumorais contra diversos ativadores de apoptose, porém, a inibição destes receptores pode deixar as células tumorais vulneráveis a diversos tratamentos anticâncer (KAKINUMA; HWANG, 2006).

Antagonistas de receptores de quimiocinas (mesmo aqueles cujo alvo são receptores com ampla distribuição, como o CXCR4) parecem ter baixa toxicidade em testes clínicos. Diferentemente das drogas antitumorais tradicionais, elas não tem demonstrado efeito citotóxico *in vitro* (KAKINUMA; HWANG, 2006).

Quimiocinas e seus receptores são moléculas multifuncionais e podem ser importantes na patogênese da progressão do câncer. Essas moléculas podem ser alvos terapêuticos que possibilitando a limitação ou o impedimento da angiogênese ou de metástases. Além disso, os antagonistas direcionados aos receptores de quimiocinas e seus ligantes podem atuar isoladamente ou como adjuvantes aos agentes quimioterápicos (ALI; LAZENNEC, 2007).

Quimiocinas e seus receptores podem ser alvos de anticorpos, os quais representam uma perspectiva no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Desta maneira há um significativo interesse no desenvolvimento de protocolos para interferir na função destas moléculas ampliando perspectivas na intervenção de metástase, principal causa de morte na maioria dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar níveis plasmáticos do malondialdeído e expressão do RNA mensageiro do CXCR4 em células do sangue periférico de pacientes nos diferentes estadiamentos do câncer de mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar o perfil etário das pacientes com câncer de mama e das doadoras de sangue saudáveis;
- b. Analisar o estadiamento da doença nas pacientes;
- c. Analisar o tipo do carcinoma apresentado pelas pacientes com câncer de mama;
- d. Avaliar os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) em pacientes com câncer de mama e indivíduos normais;
- e. Comparar os níveis plasmáticos de MDA nos diferentes estadiamentos do câncer de mama;
- f. Avaliar a expressão de RNA mensageiro do CXCR4 em indivíduos com câncer de mama e indivíduos normais;
- g. Comparar a expressão de RNA mensageiro CXCR4 nos diferentes estadiamentos do câncer de mama;
- h. Avaliar a relação entre MDA plasmático e expressão de RNA mensageiro CXCR4 em células do sangue periférico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, estando de acordo com a Resolução 196/96 – CNS.

Todas as mulheres, para serem incluídas nesse trabalho, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o presente trabalho foram utilizadas amostras de sangue periférico de 59 pacientes com câncer de mama, entre 31-76 anos, provenientes do Instituto de Câncer de Londrina e 84 mulheres doadoras de sangue normais saudáveis acima de 25 anos de idade provenientes do Hemocentro da Universidade Estadual de Londrina, PR.

Todas as amostras de sangue de pacientes com câncer de mama foram coletadas antes do tratamento.

3.1 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA SEGUNDO UICC

Para afirmar se um tumor está em estadiamento avançado ou não, usa-se um critério para a classificação dos tumores, criado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado estadiamento, baseando-se no fato de que os tumores seguem um curso biológico comum. O estadiamento clínico é importante porque permite estabelecer a extensão e a gravidade da doença, planejar o tratamento, dar o prognóstico, ou seja, prever a evolução das enfermidades, e, finalmente, agrupar os casos para estudo e pesquisa (INCA/MS, 2007).

O Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) foi desenvolvido por Pierre Denoix em meados de 1942 e representou uma tentativa de classificar o câncer baseado nos atributos morfológicos maiores dos tumores malignos que acreditavam influenciar o prognóstico da doença: tamanho do tumor primário (T), presença e extensão do envolvimento de nódulos linfáticos regionais (N), e presença de metástases distantes (M). A UICC apresentou a classificação clínica de câncer de mama baseada no Sistema TNM em 1958 e o Comitê Americano de Câncer (AJCC

– American Joint Committee on Cancer) publicou um sistema de estadiamento de câncer de mama baseado no TNM no seu primeiro manual de estadiamento de câncer em 1977 (BEAHRs, 1977). Desde então, revisões regulares têm sido emitidas para refletir maiores avanços em diagnósticos e tratamentos. Na revisão de 1987, diferenças entre as versões do AJCC e do UICC no sistema TNM foram eliminadas.

Portanto, esta avaliação tem como base a dimensão do tumor (T), a avaliação da extensão aos linfonodos (N) e a presença ou não de metástases à distância (M). Após a avaliação destes fatores, os casos são classificados em estádios que variam de I a IV graus crescentes de gravidade da doença (INCA/MS/2007).

Esta classificação aplica-se apenas aos carcinomas, sendo indispensável à confirmação histológica. Recomenda-se que, quando houver múltiplos tumores, o maior deles seja considerado para definição dos parâmetros e quando houver tumores sincrônicos bilaterais a classificação de cada um deles será isolada.

Os quadros a seguir sintetizam as classificações conforme o tamanho do tumor (T), comprometimento nodular (N) e metástases (M), além de agrupar as diversas combinações possíveis (INCA/MS, 2007).

TAMANHO DO TUMOR (T)

- Tx - tumor não pode ser avaliado
- T0 - não há evidência de tumor primário
- Tis - carcinoma *in situ*
- T1 - tumor com até 2 cm em sua maior dimensão
- T1 mic - carcinoma microinvasor (até 1 mm)
- T1a - tumor com até 0,5 cm em sua maior dimensão
- T1b - tumor com mais de 0,5 e até 1 cm em sua maior dimensão
- T1c - tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
- T2 - tumor com mais de 2 e até 5 cm em sua maior dimensão
- T3 - tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
- T4 - qualquer T com extensão para pele ou parede torácica
- T4a - extensão para a parede torácica
- T4b - edema (incluindo *peau d'orange*), ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites na mesma mama
- T4c - associação do T4a e T4b
- T4d - carcinoma inflamatório

Observações:

- a. O comprometimento do músculo grande peitoral não caracteriza T4.
- b. Presença de retração da pele ou papila não interfere no estadiamento.

LINFONODOS REGIONAIS (N)

- Nx - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
- N0 - Ausência de metástase
- N1 - Linfonodo(s) homolateral(is) móvel(is) comprometido(s)
- N2 - Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas ou metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral
- N2a - Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) uns aos outros ou fixos à estruturas vizinhas
- N2b - Metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral(is) em evidência clínica de metástase axilar
- N3 - Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es), ou para linfonodo(s) da mamária interna homolateral clinicamente aparente na presença de evidência clínica de metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), ou metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es) ou da mamária interna
- N3a - Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is)
- N3b - Metástase para linfonodo(s) da mamária interna homolateral e para linfonodo(s) axilar(es)
- N3c - Metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is)

Observação: Clinicamente aparente é definido como detectado por estudos de imagem (exceto linfocintigrafia), pelo exame clínico ou pelo diagnóstico patológico macroscópico.

METÁSTASES (M)

- Mx metástase à distância não pode ser avaliada
- M0 ausência de metástase à distância
- M1 presença de metástase à distância (incluindo LFN supraclaviculares)

ESTADIAMENTO TNM DO CÂNCER DE MAMA POR AGRUPAMENTOS

Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II A	T0 N1 M0
	T1 N1 M0
	T2 N0 M0
Estádio II B	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
Estádio III A	T0 N2 M0
	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
	T3 N2 M0
Estádio III B	T4 N0 M0
	T4 N1 M0
	T4 N2 M0
Estádio III C	Tqq N3 M0*
Estádio IV	Tqq Nqq M1*

Fonte: UICC, 2002; * qq = qualquer

3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As amostras de plasma foram armazenadas a -80°C para a determinação do MDA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (PILZ et al., 2000; MATEOS et al., 2005). Foram adicionados $50\ \mu\text{L}$ de $\text{NaOH}\ 6.0\ \text{molL}^{-1}$ em $250\ \mu\text{L}$ de plasma. Para a hidrólise alcalina das proteínas ligadas ao MDA a mistura acima foi incubada a 60°C em banho-maria por 30 min. A precipitação das proteínas foi realizada com adição de $125\ \mu\text{L}$ de ácido perclórico 35 % (v/v) e centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante ($250\ \mu\text{L}$) foi transferido para microtubos novos e a derivatização foi realizada com a adição de $25\ \mu\text{L}$ de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH; Sigma Chemical Co. Madri, Spain) a $5.0\ \text{mmolL}^{-1}$ em $2.0\ \text{molL}^{-1}$ de ácido hidroclorídrico. As amostras foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente e

protegidas da luz. Uma alíquota de 50.0 μL dessa reação foi injetada em um sistema de CLAE constituído de uma bomba (LC-10AD; Shimadzu, Kyoto, Japan), uma válvula (Rheodyne 7725 Cotati, E.U.A.) e um detector (2487 Dual Absorbance; Waters, Milford, E.U.A.). A cromatografia foi realizada em um *Microsorb* - MV 100-5 C-18 (250 x 4.6 mm) (Varian Inc., Palo Alto, E.U.A.). As amostras foram isocraticamente eluídas com uma fase móvel de acetonitrila: água *Milli-Q* ultrapura (Millipore, Bedford, Massachusetts, E.U.A.) acidificada com ácido acético 0.2% (50:50, v/v). A taxa de fluxo foi de 0.6 mL/min a 30°C. Os cromatogramas foram gerados em um comprimento de onda de 310 nm (0.0025 AUFS) e processados pelo software *Empower*. As curvas de calibração foram preparadas através da diluição de uma solução padrão de MDA (20.0 nmol/mL). O padrão do MDA foi preparado a partir de 25 μL de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP; Sigma) em 100 mL de água resultando em uma solução de estoque de 1.0 mmolL⁻¹. O padrão utilizado foi preparado utilizando 1.0 mL TEP da solução estoque em 50.0 mL de ácido sulfúrico a 1 % e incubação por 2 h a temperatura ambiente. O padrão de MDA resultante de 20.0 nmol/mL foi posteriormente diluído em 1% de ácido sulfúrico para atingir as concentrações finais de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 nmol/mL para a realização da curva usada para a quantificação. A curva padrão foi linear para as concentrações de MDA e as áreas dos picos no CLAE variaram de 0.625 até 20.0 nmol/mL para o MDA total ($r > 0.99$).

Uma curva padrão usada para quantificação era preparada para cada dia de experimento. Em todas as curvas, os padrões foram tratados como as amostras.

O padrão do MDA foi preparado a partir de 25 μL de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP; Sigma) em 100 mL de água resultando em uma solução de estoque de 1.0 mmolL⁻¹. O padrão utilizado foi preparado utilizando 1.0 mL TEP da solução estoque em 50.0 mL de ácido sulfúrico a 1 % e incubação por 2 h a temperatura ambiente. O padrão de MDA resultante de 20.0 nmol/mL foi posteriormente diluído em 1% de ácido sulfúrico para atingir as concentrações finais de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 nmol/mL para a realização da curva usada para a quantificação. A curva padrão foi linear para as concentrações de MDA e as áreas dos picos no CLAE variaram de 0.625 até 20.0 nmol/mL para o MDA total ($r > 0.99$).

3.3 ANÁLISE MOLECULAR

3.3.1 Obtenção de Leucócitos Para Extração de RNA

A partir de 4 mL de sangue periférico coletado em tubo com heparina foi realizada extração de RNA. A amostra de sangue foi centrifugada a 250 g por 10 min, o sobrenadante (plasma) foi separado para quantificação de MDA e a camada de leucócitos da interfase foi coletada. As hemácias foram lisadas em solução de lise de hemácias (solução A: 0,32M Sacarose; 10mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM MgCl₂ e 1% de Triton X-100) em um volume final de 15 mL e o material foi centrifugado a 200 g a temperatura ambiente por 7 min. O sobrenadante foi descartado. Ao sedimento de leucócitos adicionou-se 700 µL de *TRizol-LS* (Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.). A partir dessa etapa o RNA foi extraído seguindo as instruções do fabricante.

O RNA obtido foi ressuspenso em água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC; LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) estéril, livre de RNAses, DNAses e resíduos de proteínas.

3.3.2 Quantificação Das Amostras De RNA

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho UV-1650PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) no comprimento de onda de 260 nm considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 40 µg RNA/mL. Foi também realizada leitura no comprimento de onda de 280 nm. O grau de pureza em relação à contaminação por proteínas foi medido através da relação entre as absorvâncias nos comprimentos de 260 nm e 280 nm (260/280). Foram utilizadas nos experimentos amostras de RNA que apresentaram relações de absorvâncias maior ou igual a 1,7 (260/280 ≥ 1,7) (WHITE & DE LUCCA, 1977), pois

são consideradas com baixas concentrações de proteínas. A análise da integridade das amostras de RNA foi avaliada por RT-PCR para β -actina.

3.3.3 Síntese de DNAc

Para a realização da reação da transcrição reversa as amostras foram incubadas previamente a 60°C por 10 min e, em seguida, armazenadas no gelo até o momento da reação.

A transcrição reversa foi realizada a partir de 500 ng de RNA utilizando 4U de *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen) e 20U de *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT, Invitrogen) e submetida a um termociclador *PCR Sprint ThermoHybaid* (Biosystems, Guelph, Canada), a 45°C por 60 min. As condições da reação estão descritas no quadro a seguir:

Reagentes	Volume
MgCl ₂ 25mM	4,0 μ L
10X PCR Buffer	2,0 μ L
dNTP 1,25mM	4,0 μ L
Primer oligo d(T) 2,5 μ M	4,0 μ L
Inibidor Ribonuclease 2U/ μ L	2,0 μ L
M-MLV RT 10U/ μ L	2,0 μ L
RNA	7 μ L
Volume Final	25 μ L

3.3.4 Quantificação Das Amostras de DNAc

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho UV 1650PC (Shimadzu) no comprimento de onda de 260 nm considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 37 μ g/mL de DNAc (BARKER, 2002).

A quantidade de DNAc utilizada para a reação de PCR em tempo real foi previamente determinada através de uma curva na qual foram utilizadas quantidades de 80, 40, 20, 10, 5 e 2.5 η g de DNAc. Para a realização da curva, foi utilizada uma amostra aleatória de DNAc preparada em duplicata para cada quantidade de DNAc determinada acima, e para cada gene estudado nesse trabalho.

3.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase – β -actina

Foram realizadas PCRs para o RNAm da β -act a fim de verificar a integridade do RNA, a viabilidade do DNAc e possível contaminação por DNA genômico.

Os *primers* utilizados para a amplificação foram baseados na sequência do *GenBank* BC014861: *primer* β -act 1 – *sense*: 5' GCTCGTCGTCGACAACGGCTC 3', e *primer* β -act 2 – *antisense* 5' CTGGGTCATCTTCTC 3', conforme mostrado abaixo em amarelo.

LOCUS BC014861 1884 bp mRNA linear
 DEFINITION Homo sapiens actin, beta, mRNA, complete cds.
 ACCESSION BC014861
 VERSION BC014861.1 GI:15928802
 KEYWORDS MGC.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)

```

61 gccgccagct caccatggat gatgatatcg ccgcgctcgt cgtcgacaac ggctc cggca
121 tgtgcaaggc cggcttcgcg ggcgacgatg cccccgggc cgtcttccc tccatcgtgg
181 ggcgccccag gcaccagggc gtgatggtgg gcatgggtca gaaggattcc tatgtgggcg
241 acgaggccca gagcaagaga ggcacacctca ccctgaagta ccccatcgag cacggcatcg
301 tcaccaactg ggacgacatg gagaaaatct ggcaccacac cttctacaat gagctgcgtg
361 tggctcccga ggagcacccc gtgctgctga ccgaggcccc cctgaacccc aaggccaacc
421 gcgagaagat gacccagatc atgtttgaga ccttcaacac ccagccatg tacgttgcta

```

Foram utilizados 100 ng de DNAC para a PCR da β -actina.

A reação foi realizada no termociclador *PCR Sprint ThermoHybaid* (Biosystems) utilizando-se 0.5 U de *Taq polimerase* (Invitrogen) de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes	Volume
10X PCR Buffer	2,5 μ L
MgCl ₂ 50mM	0,75 μ L
dNTP 1,25mM	3,0 μ L
β -act 1 sense 2,5 μ M	2,5 μ L
β -act 2 antisense 2,5 μ M	2,5 μ L
<i>Taq polimerase</i> (1:10)	2,5 μ L
H ₂ O ultra pura (<i>Milli-Q</i>)	8,75 μ L
DNAC	2,5 μ L
Volume Final	25 μ L

As etapas da reação estão descritas abaixo:

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
94°C	1 min	1
94°C	30 seg	35
55°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	<i>Infinito</i>	

O fragmento amplificado de β -actina de 353 pares de bases foi observado após eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, 80 V por 1.5 h e coloração por prata.

3.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) – GAPDH

Para este estudo foi utilizado o gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como gene constitutivo. A reação foi realizada em triplicata para cada amostra de DNAc utilizada.

Os *primers* utilizados para amplificação do RNAm GAPDH foram baseados na seqüência depositada no *GenBank* NM_002046: *primer* sense 5' GAAGGTGAAGGTCGGA 3' e *primer* antisense 5' GGGTCATTGATGGCAACAA 3', conforme mostrado abaixo em amarelo. Esses *primers* são utilizados rotineiramente pelo Hospital A. C. Camargo de São Paulo.

LOCUS NM_002046 1310 bp mRNA linear PRI 11-FEB-2007
 DEFINITION Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA.
 ACCESSION NM_002046
 VERSION NM_002046.3 GI:83641890
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)

ORIGIN

```

1aaattgagcc cgcagcctcc cgcttcgctc tctgctcctc ctgttcgaca gtcagccgca
61 tcttcttttg cgtcgccagc cgagccacat cgctcagaca ccatggggaa ggtgaaggtc
121 ggaagtcaacg gattttggctg tattggggcgc ctggtcacca gggctgcttt taactctggt
181aaagtggata ttggtgccat caatgacccc ttcatgacc tcaactacat ggtttacatg
241ttccaatatg attccaccca tggcaaattc catggcaccg tcaaggctga gaacgggaag
301cttgtcatca atggaaatcc catcaccatc ttccaggagc gagatccctc caaaatcaag
361tggggcgatg ctggcgctga gtacgtcgtg gagtccactg gcgtcttcac caccatggag
421aaggctgggg ctcatttgca ggggggagcc aaaagggtca tcatctctgc cccctctgct
481gatgccccca tgttcgtcat ggggtgtaac catgagaagt atgacaacag cctcaagatc
541atcagcaatg cctcctgcac caccaactgc ttagcacccc tggccaaggt catccatgac
601aactttggta tcgtggaagg actcatgacc acagtccatg ccatcactgc caccagaag
661actgtggatg gcccctccgg gaaactgtgg cgtgatggcc ggggggctct ccagaacatc
721atccctgcct ctactggcgc tgccaaggct gtgggcaagg tcatccctga gctgaacggg
781aagctcactg gcatggcctt cctgtcctcc actgccaacg tgtcagtggg ggacctgacc
841tgccgtctag aaaaacctgc caaatatgat gacatcaaga aggtggtgaa gcagggctcg
901gagggcccc tcaagggcat cctgggctac actgagcacc aggtggtctc ctctgacttc
961aacagcgaca cccactcctc cacctttgac gctggggctg gcattgccct caacgaccac
1021tttgtcaagc tcatttcctg gtatgacaac gaatttggct acagcaacag ggtggtggac
1081ctcatggccc acatggcctc caaggagtaa gaccctgga ccaccagccc cagcaagagc
1141acaagaggaa gagagagacc ctactgctg gggagtccct gccacactca gtccccacc
1201acactgaatc tcccctcctc acagttgcca tgtagacccc ttgaagaggg gaggggacct
1261gggagccgca ccttgtcatg taccatcaat aaagtaccct gtgctcaacc

```

A reação de PCR em tempo real foi realizada no sistema de detecção *Chromo4™ Real Time PCR Detection* (BIO-RAD, Hercules, E.U.A.) utilizando-se o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen). A amplificação foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes	Volume
Platinum SYBR Green	10,0 µL
H ₂ O ultrapura (<i>Milli-Q</i>)	3,5 µL
GAPDH 1 <i>sense</i> 2,5µM	2,0 µL
GAPDH 2 <i>antisense</i> 2,5µM	2,0 µL
DNAc	2,5 µL
Volume Final	20 µL

As etapas da reação estão descritas abaixo:

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
50°C	2 min	1
95°C	2 min	1
95°C	30 seg	40
54°C	30 seg	
72°C	30 seg	
Plate Read		
72°C	10 min	1
Melting Curve de 50°C a 98°C, leitura a cada a 0,5°C por 2 seg		

3.3.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) – CXCR4

Foram utilizados 20 ηg de DNAc, e assim como para o GAPDH a reação foi realizada em triplicata para cada amostra de DNAc.

Os *primers* utilizados para amplificação do RNAm CXCR4 foram baseados na seqüência depositada no *GenBank* AF025375: *primer* sense 5' TGTTGGCTGAAAAGGTGGTC 3' e *primer* antisense 5' AAAGATGAAGTCGGGAATAGTC 3', conforme mostrado abaixo em amarelo.

LOCUS AF025375 1059 bp mRNA linear PRI 28 OCT-1997
 DEFINITION Homo sapiens chemokine receptor-4 (CXCR4) mRNA,
 complete cds.
 ACCESSION AF025375
 VERSION AF025375.1 GI:2565335
 KEYWORDS
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)

ORIGIN

```

1 atggagggga tcagtatata cacttcagat aactacaccg aggaaatggg ctcagggggac
61 tatgactcca tgaaggaacc ctgtttccgt gaagaaaatg ctaatttcaa taaaatcttc
121 ctgcccacca tctactccat catcttctta actggcattg tgggcaatgg atttggtcatc
181 ctggatcatg gttaccagaa gaaactgaga agcatgacgg acaagtacag gctgcacctg
241 tcagtggccg acctcctctt tgtcatcacg ctcccttctt gggcagttga tgccgtggca
301 aactggtaact ttgggaactt cctatgcaag gcagtccatg tcatctacac agtcaacctc
361 tacagcagtg tcctcatcct ggcttcatc agtctggacc gctacctggc catcgtccac
421 gccaccaaca gtcagaggcc aaggaagctg ttggctgaaa aggtgggtc ta tgttggcgtc
481 tggatccctg ccctcctgct gactattccc gacttcatct ttgccaacgt cagtgaggca
541 gatgacagat atatctgtga ccgcttctac cccaatgact tgtgggtggg tgtgttccag
601 tttcagcaca tcatggttgg ccttatcctg cctggtattg tcatcctgct ctgctattgc
661 attatcatct ccaagctgtc aactccaag ggccaccaga agcgcaaggc cctcaagacc
721 acagtcatcc tcatcctggc tttcttcgcc tgttggctgc ctactacat tgggatcagc
781 atcgactcct tcatcctcct ggaaatcatc aagcaagggt gtgagtttga gaacactgtg
841 cacaagtgga tttccatcac cgaggcccta gctttcttcc actggtgtct gaaccccatc
901 ctctatgctt tccttggagc caaatttaa acctctgccc agcagcact cacctctgtg
961 agcagagggg ccagcctcaa gatcctctcc aaaggaaagc gaggtggaca ttcactctgtt
1021 tccactgagt ctgagtcttc aagttttcac tccagctaa

```

A reação foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes	Volume
Platinum SYBR Green	10,0 µL
H ₂ O ultrapura (<i>Milli-Q</i>)	3,5 µL
CXCR4 1 <i>sense</i> 2,5µM	2,0 µL
CXCR4 2 <i>antisense</i> 2,5µM	2,0 µL
DNase	2,5 µL
Volume Final	20 µL

As etapas da reação estão descritas abaixo:

Temperatura	Tempo	N° de Ciclos
50°C	2 min	1
95°C	2 min	1
95°C	30 seg	40
54°C	30 seg	
72°C	30 seg	
Plate Read		
72°C	10 min	1
Melting Curve de 50°C a 98°C, leitura a cada 0,5°C por 2 seg		

A expressão de CXCR4 de cada amostra foi calculada através da fórmula abaixo considerando as eficiências, segundo Pfaffl (2001):

$$E_{CXCR4} = \frac{2^{CT_{normal} - CT_{ca.mama}}}{2^{CT_{normal} - CT_{ca.mama}}}$$

$$E_{GAPDH} = \frac{2^{CT_{normal} - CT_{ca.mama}}}{2^{CT_{normal} - CT_{ca.mama}}}$$

O valor de E representa as eficiências tanto do CXCR4 quanto do GAPDH. Para a obtenção do E_{CXCR4} , por exemplo, calculou-se a média das eficiências do CXCR4 das triplicatas de cada amostra. Dessa mesma forma foi obtido o valor do E_{GAPDH} .

Para uma eficiência de 100%, a quantidade de DNA será dobrada a cada ciclo, para uma eficiência de 90% a quantidade de DNA será aumentada de 1 a 1.9 em cada ciclo, e para 80% e 70% será aumentada de 1.8 e 1.7 em cada ciclo, respectivamente. Uma pequena diferença na eficiência pode acarretar em uma grande diferença na quantidade de produto final.

Os valores de CT representam uma média dos valores de CT das triplicatas de cada grupo e para cada gene.

CT é o ciclo em que a fluorescência cruza o *threshold* (linha que determina o limiar da fluorescência). O CT é inversamente proporcional à quantidade de material.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste *t-Student* através do software de análise gráfica e científica OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, E.U.A.). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDADE

O câncer de mama, provavelmente o mais temido pelas mulheres devido à alta frequência, apresenta-se como a segunda neoplasia maligna mais incidente no mundo. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (INCA, 2004).

A idade, depois do sexo, é o fator de risco mais importante para o câncer de mama (OSTEEN, 2001).

O perfil etário das pacientes estudadas está apresentado na figura 6 e constitui-se de 73% (43/59) acima dos 45 anos de idade, enquanto que 27% (16/59) das mulheres com câncer de mama situam-se abaixo dos 45 anos.

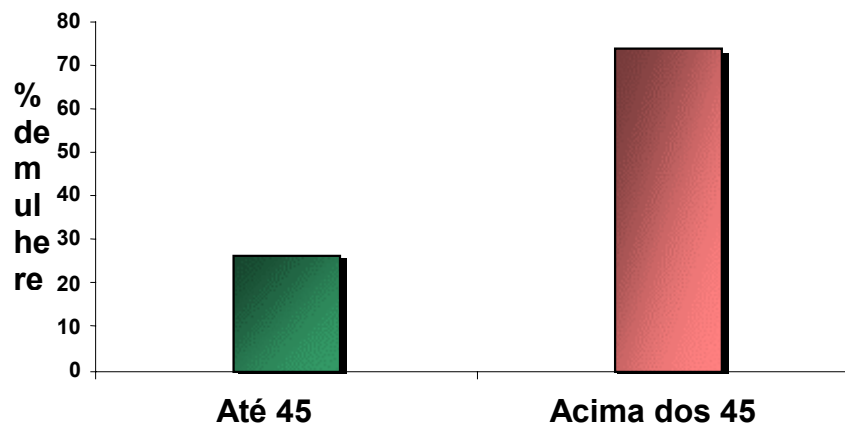


Figura 6 – Perfil etário das mulheres com câncer de mama. Foi observada maior prevalência de câncer de mama entre as mulheres acima dos 45 anos de idade (73%, 43/59).

A incidência do câncer de mama e as taxas de morte geralmente aumentam com a idade. No período de 2000 a 2004 nos EUA, 95% dos novos casos

e 97% de mortes por câncer de mama ocorreram em mulheres com 40 anos ou mais (RIES et al., 2007).

Em relação ao perfil etário das doadoras de sangue, 32.14% possuíam idade acima dos 45 anos de idade.

Apesar das populações estudadas terem idade significativamente diferente, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que mostrasse que a idade estivesse envolvida com os parâmetros analisados nesse trabalho.

4.2 ESTADIAMENTO

Em relação ao estadiamento do câncer de mama das pacientes, os dados foram obtidos, logo após o diagnóstico da doença.

Conforme mostrado na figura 7 havia maior número de pacientes com câncer de mama no estágio II (49.1%, 29/59), seguido do estágio III (42.4%, 25/29), estágio IV (5.1%, 3/59) e estágio I (3.4%, 2/59).

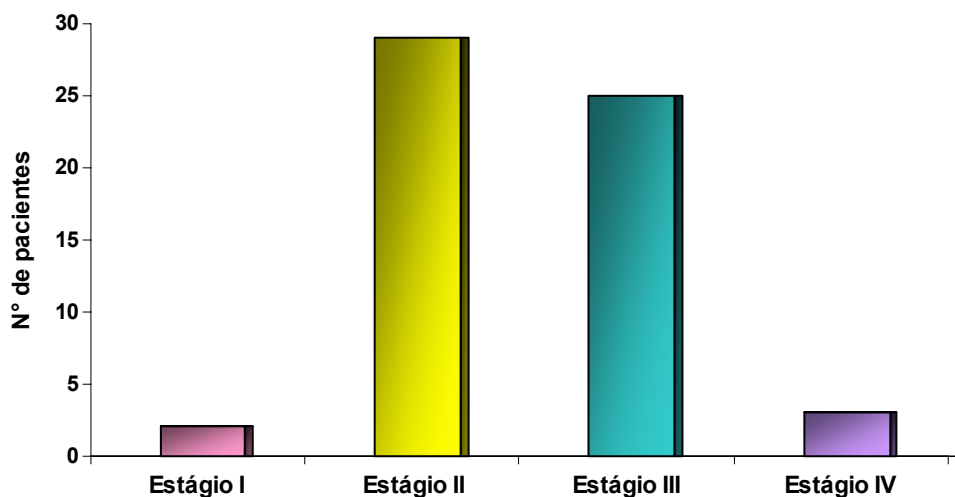


Figura 7 – Distribuição das pacientes nos diferentes estadiamentos do câncer de mama. Observou-se maior número de pacientes no estágio II da doença (49.1%, 29/59), seguido do estágio III (42.4%, 25/59), estágio IV (5.1%, 3/59) e estágio I (3.4%, 2/59).

O diagnóstico precoce tanto do câncer de mama como de outros tipos de câncer consegue detectar a presença da doença em estágios iniciais. Um dos fatores que dificultam o tratamento é a descoberta da doença já em um estágio avançado. A maioria dos casos de câncer de mama no Brasil é diagnosticada em estágios avançados (III e IV), diminuindo as chances de sobrevivência das pacientes e comprometendo os resultados do tratamento (INCA/MS, 2007).

Uma das causas no retardo do diagnóstico pode ser o reflexo da inexistência de uma política consistente de controle da doença através do diagnóstico precoce, que tem na mamografia o seu instrumento fundamental (ABREU; KOIFMAN, 2002). Segundo Koch et al. (2000), além de insuficientes em número, os mamógrafos existentes no Brasil encontram-se mal distribuídos, estando a sua grande maioria (76,7%) instalados em clínicas radiológicas privadas e com maior concentração nas regiões sudeste e sul do país.

No presente estudo a maioria das pacientes estavam no estágio II e III da doença, isso pode ser explicado pelas melhores condições sócio-econômicas e dos sistemas de saúde da cidade de Londrina-PR em comparação com os demais lugares do Brasil.

Demonstrou-se que mulheres mais idosas que não fazem mamografia (nesse grupo foram incluídas mulheres que não fizeram o exame dentro dos 2 anos antes do diagnóstico) foram diagnosticadas com câncer de mama no estágio II ou estágios mais avançados mais frequentemente em comparação com mulheres que fazem mamografia regularmente (de 10 em 10 meses) (MCCARTHY et al., 2000).

4.3 TIPOS DE CARCINOMA

Carcinomas de mama podem ser classificados em ductal e lobular. Os ductais têm origem nos ductos das glândulas e os lobulares nos lóbulos das glândulas.

Carcinoma Ductal Invasor (CDI) e Carcinoma Lobular Invasor (CLI) são os principais tipos histológicos de câncer de mama invasor entre mulheres de diferentes raças, variando de 70 a 75% e 10 a 14%, respectivamente (HARRIS et al.,

1992). O carcinoma lobular é menos comum que o carcinoma ductal e seu diagnóstico é mais difícil devido ao seu padrão infiltrativo discreto (LI et al., 2003). Pesquisas recentes têm reportado um aumento desproporcional de carcinoma lobular invasor nos Estados Unidos e na Europa, possivelmente associado com o aumento no uso da terapia de reposição hormonal combinada (LI et al., 2000a, b, 2003; VERKOOIJEN et al., 2003).

Nesse estudo foi observada a distribuição dos tipos de adenocarcinomas entre as pacientes. Foi verificado que mais de 90% (55/59) era do tipo ductal invasor, 3.4% (2/59) era do tipo lobular invasor e 3.4% não foi identificado, conforme a figura 8.

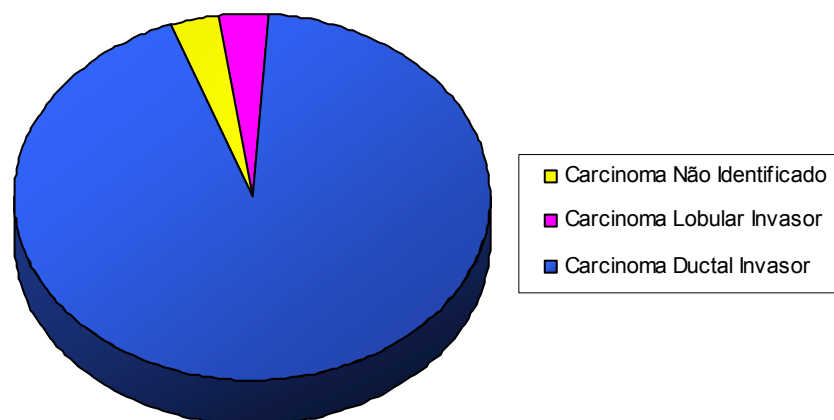


Figura 8 – Distribuição dos tipos de carcinoma mamário nas pacientes. Observou-se que 93.2% (55/59) dos carcinomas eram do tipo ductal invasor, enquanto 3.4% (2/59) eram do tipo lobular invasor e 3.4% (2/59) não foram identificados.

Apesar da desigualdade histológica, esses tipos de tumores mostram similaridades e diferenças clínicas. Características como sítio tumoral, tamanho, grau e estágio são similares para ambos os tipos (WINCHESTER et al., 1998). O CLI geralmente apresenta sinais sutis no exame físico e na mamografia devido a sua histologia característica e ausência de reação tecidual. A diferença nas taxas de sobrevivência entre as pacientes com CDIs e CLIs é controversa (YEATMAN et al., 1995; TOIKKANEN et al., 1997; WINCHESTER et al., 1998).

Entretanto, os padrões metastáticos do CDI e do CLI são claramente distintos. O CLI é caracterizado pela maior prevalência de metástases gastrointestinal, ginecológica, peritoneal e retroperitoneal; e particularmente para sítios como glândulas adrenais e ovários (DIXON et al., 1991; BORST; INGOLD, 1993; BUMPERS et al., 1993; SASTRE-GARAU et al., 1996), enquanto no CDI o envolvimento de pulmão e pleura é mais freqüente, bem como o envolvimento de linfonodos distantes e do sistema nervoso central (ARPINO et al., 2004).

Dentre as pacientes, 2 pacientes com carcinoma lobular invasor (estadiamento II e IV) apresentaram idade superior a 59 anos e 2 pacientes com adenocarcinoma (estadiamento III) apresentaram idade acima de 43 anos. Apesar dos tipos diferenciados de carcinoma, não houve alteração nos parâmetros avaliados no presente trabalho.

Alguns estudos mostraram que pacientes com CLI possuem uma média de idade superior no diagnóstico comparada com a dos pacientes com CDI (SILVERSTEIN et al., 1994; SASTRE-GARAU et al., 1996; DIAB et al., 2000). A idade avançada nos pacientes com CLI pode ser atribuída a baixa taxa proliferativa ou a maiores dificuldades na detecção do CLI (ARPINO et al., 2004).

4.4 ANÁLISE DO MDA

É considerado que o aumento do estresse oxidativo e da lipoperoxidação esteja envolvido na patofisiologia de todos os cânceres. Gönenç et al. (2001) e Kumaraguruparan et al. (2002) demonstraram que em pacientes com câncer de pulmão e com câncer de mama a lipoperoxidação está aumentada. Nos últimos anos, utilizando o MDA como marcador do estresse oxidativo, observa-se um interesse crescente no estudo do papel da lipoperoxidação na progressão do câncer. Um dos objetivos desse estudo foi analisar o estresse oxidativo em pacientes com câncer de mama através da avaliação de níveis plasmáticos de um dos produtos da lipoperoxidação, o MDA.

O MDA é mais frequentemente determinado espectrofotometricamente como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este é um método simples e de baixo custo, porém altamente impreciso,

uma vez que o ácido tiobarbitúrico (TBA) reage não somente com o MDA, mas também com uma variedade de outros componentes (carboidratos, aminoácidos, pigmentos, piridinas, etc.) (JANERO, 1990; YEO et al., 1994) resultando em uma variabilidade nos resultados. Por outro lado, a cromatografia avalia especificamente o 2TBA-MDA após separação por CLAE de fase reversa com detecção por fluorescência (SUTTNAR et al., 1997; VOLPI et al., 1998) ou por UV-vis em 532 nm (SUTTNAR et al., 2001). Entretanto, a reação do MDA com o TBA nesse caso ainda requer tratamento em altas temperaturas (95-100°C) por tempos estendidos de incubação (até 150 min) (SAKAI et al., 1999; CHIRICO et al. 1994; FUKUNAGA et al. 1995; VOLPI et al. 1998) em condições fortemente ácidas (pH 1.5-3.5), que podem resultar em uma peroxidação artificial dos constituintes das amostras mesmo na presença de antioxidantes como o BHT (2,6-di-terc-butil-p-hidroxitolueno) (MATEOS et al. 2005). Uma forma alternativa de avaliar o MDA, através da derivatização do MDA com DNPH e sua conversão em derivados de pirazola e hidrazona, tem sido usada por permitir estimativas específicas desse componente, especialmente quando essa técnica é associada à separação por CLAE (EKSTROM et al., 1988; CORDIS et al., 1993). Essa metodologia foi utilizada no presente estudo por ser sensível e reprodutível na avaliação dos níveis de MDA plasmáticos.

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

A partir dos cromatogramas, obtidos por CLAE, correspondentes às concentrações padrões de MDA, obteve-se o valor do tempo de retenção característico do MDA, e assim, foi possível quantificar os níveis de MDA presentes nas amostras estudadas.

A partir da análise dos níveis de MDA no plasma foram obtidos cromatogramas que registraram as áreas dos picos proporcionais aos níveis de MDA em cada amostra. O pico do MDA e seu tempo de retenção (10.900 min) característico estão mostrados em vermelho na figura abaixo:

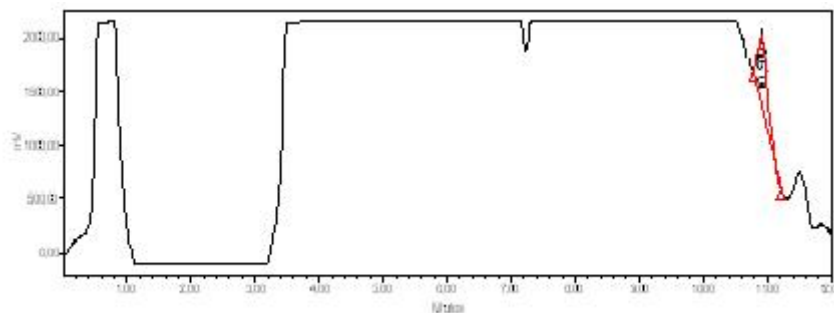


Figura 9 – Cromatograma de uma amostra de plasma de uma paciente com câncer de mama. A figura mostra o perfil cromatográfico do MDA e seu tempo de retenção igual a 10.900 min.

A determinação dos níveis de MDA nas amostras de plasma de doadoras saudáveis e de pacientes com câncer de mama revelou uma quantidade significativamente superior ($p < 0.0001$) de MDA presente no plasma das pacientes. As médias das dosagens das amostras do grupo controle e das pacientes foram 0.34 ± 0.03 e 1.41 ± 0.11 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, como mostrado na figura 10.

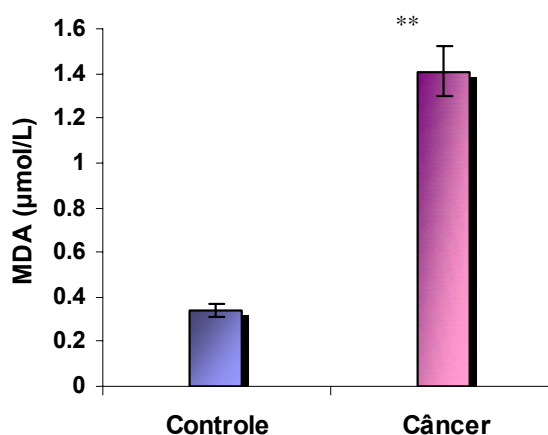


Figura 10 – Concentração de MDA no plasma de doadoras saudáveis (Controle) e de pacientes com câncer de mama (Câncer). (** $p < 0.0001$).

As médias das concentrações de MDA nos diferentes estágios (figura 11) do câncer de mama nas pacientes estudadas foram comparadas com as médias tanto do grupo controle quanto do grupo total de câncer. Observou-se que houve diferença estatística ($p < 0.0001$) entre as médias das concentrações de MDA

nos estágios II e III (1.54 ± 0.17 e 1.35 ± 0.16 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) quando comparadas à média do grupo controle (0.34 ± 0.03 $\mu\text{mol/L}$). Já as médias das concentrações de MDA nos estágios I e IV (0.78 ± 0.07 e 1.05 ± 0.37 $\mu\text{mol/L}$) foram maiores que a média do controle, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação à comparação das médias dos níveis de MDA nos diferentes estágios com a média do grupo total de câncer (1.41 ± 0.11 $\mu\text{mol/L}$), verificou-se que as médias nos estágios I e IV (0.78 ± 0.07 e 1.05 ± 0.37 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente), apesar do número pequeno de amostras, foram significativamente mais baixas ($p < 0.05$). Porém esses estágios apresentaram valores de MDA superiores ao valor do controle. A média do MDA no estágio II foi maior quando comparada com o grupo total de câncer, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando compararam-se os valores de MDA entre os estágios, observou-se que houve diferença estatística somente quando comparou-se o estágio I com o II, e o estágio I com o III ($p < 0.05$).

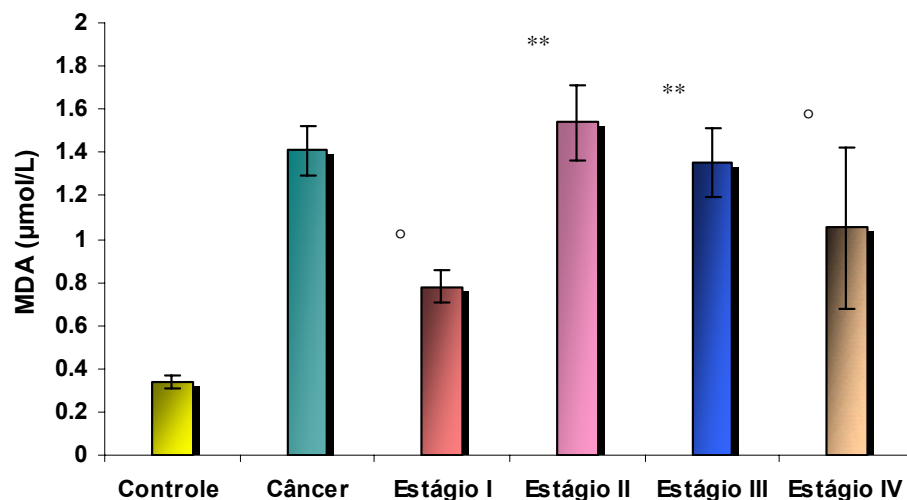


Figura 11 – Concentrações de MDA no plasma de doadoras saudáveis (Controle), pacientes com câncer de mama (Câncer) e pacientes com câncer de mama distribuídas nos estágios I, II, III e IV. Estágios II e III em relação ao grupo controle (** $p < 0.0001$). Estágios I e IV em relação ao grupo câncer (° $p < 0.05$).

As concentrações de MDA nos diferentes estadiamentos do câncer de mama mostraram-se estatisticamente elevados somente nos estágios II e III quando comparados ao controle. A partir desses resultados não foi possível verificar

se o nível de estresse oxidativo e MDA poderia estar relacionado com a progressão da doença uma vez que o número de amostras nos estágios I e IV foi pequeno.

Há vários estudos que revelam um aumento na concentração de MDA em pacientes com neoplasias (THANGARAJU et al., 1994; RAY et al., 2000; SENER et al., 2007) e nossos resultados mostrando crescentes níveis de MDA fornecem mais evidências sobre essa relação. No presente trabalho as concentrações de MDA foram significativamente maiores nas pacientes com câncer comparadas as do grupo controle. Também foi demonstrado que a lipoperoxidação em tecido no câncer de mama foi elevada em comparação com tecidos normais (TAS et al., 2005).

Foi demonstrado que as concentrações de MDA plasmáticas em pacientes com câncer de mama estão aumentadas de maneira gradual do estágio I ao estágio IV quando comparadas com o grupo controle (KHANZODE et al., 2004).

O óxido nítrico e o MDA possuem um papel relevante em relação a danos no DNA, permutação de cromátides irmãs e carcinogênese. Ray et al. (2001) verificaram que pacientes no estágio II da doença apresentaram maior concentração tanto de óxido nítrico (NO) quanto de MDA quando comparado ao grupo controle.

No presente estudo também foi verificada concentração de MDA mais elevada no estágio II ($1.54 \mu\text{mol/L} \pm 0.17$). No estágio III, o MDA também se mostrou significativamente elevado ($1.35 \mu\text{mol/L} \pm 0.16$) em relação ao controle ($0.34 \pm 0.17 \mu\text{mol/L}$). De forma semelhante Ray et al. (2000) constataram que o MDA estava elevado de maneira significativa nos estágios II e III comparado ao controle.

Existem controvérsias em relação à possibilidade da alta concentração de MDA contribuir para o surgimento da neoplasia, ou o tumor, devido seu ambiente inflamatório, favorecer o aumento do estresse oxidativo e elevar a concentração de MDA plasmático. As concentrações de MDA entre as pacientes com câncer de mama foram estatisticamente maiores do que entre as doadoras de sangue saudáveis, o que permite considerar que o estresse oxidativo nessas pacientes ocorreu de forma mais intensa, comparado ao grupo controle. Porém, ainda não é esclarecido se o intenso estresse oxidativo nas mulheres contribui para a carcinogênese mamária ou se ele é resultado do processo inflamatório que pode ocorrer durante a patogênese do câncer. No presente estudo, verificamos que algumas amostras do grupo controle, representado por indivíduos saudáveis,

apresentaram concentrações elevadas de MDA. Se este aumento pode desencadear o surgimento de alguma neoplasia é uma questão que merece futuras investigações.

O estresse oxidativo causado por espécies reativas do oxigênio (ROS) danifica o DNA, proteínas e lipídios, e é amplamente reconhecido como uma das causas do desenvolvimento de doenças crônicas. Peróxidos lipídicos e seus produtos podem causar danos a enzimas ligadas à membrana e outras macromoléculas, incluindo o DNA, e têm sido implicados em uma variedade de doenças incluindo o câncer (KUMAR et al., 1991; TORUN et al., 1995). Um dos principais produtos de ácidos graxos poliinsaturados é o malondialdeído (MDA) (PILZ et al., 2000) que tem sido relatado sobre seus efeitos mutagênicos e citotóxicos (MATEOS et al., 2005).

Na inflamação os leucócitos e outras células fagocíticas induzem danos ao DNA das células proliferativas através da geração de substâncias reativas do oxigênio e do nitrogênio (ROS e RNS) que são produzidas normalmente por essas células para combater a infecção (MAEDA; AKAIKE, 1998). Durante a inflamação, a produção aumentada de ROS/RNS pode induzir danos ao DNA, inibição da apoptose e ativação de proto-oncogenes pelas vias de transdução de sinal. Produção de ROS/RNS na inflamação crônica do pulmão pode predispor indivíduos ao câncer de pulmão (AZAD et al., 2008).

Dentre dados que sugerem um papel regulatório para o ROS e para os antioxidantes, é conhecida sua modulação de fatores de transcrição, proteínas kinases e fosfatases (SUN; OBERLEY, 1996). O sinal gerado nos receptores de membrana pelos fatores de crescimento e citocinas é geralmente associado ao nível aumentado de ROS (LO; CRUZ, 1995; BAE et al., 1997). Estudos têm mostrado que as ROS podem participar no recrutamento de neutrófilos através da regulação aumentada de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos (BRADLEY et al., 1993). O papel dos segundos mensageiros na transdução de sinais requer concentrações de ROS pequenas e não tóxicas que podem ser produzidas por todos os tipos celulares. Tem sido mostrado que as ROS afetam a produção da quimiocina IL-8 em células dendríticas e monócitos (VERHASSELT et al., 1998; LEE et al., 1999), proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 e MIP-1 α na linhagem NR8383 de macrófagos alveolares (SHI et al., 1996). Esses efeitos podem ser mediados através da ação das ROS nas proteínas redox sensíveis, tais como o fator de transcrição

nuclear NF-kappaB (MEYER et al., 1994; LOS et al., 1995; BAEUERLE, 1998). O fator de transcrição NF-kappaB está envolvido na regulação de uma variedade de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória. Além disso, NF-kappaB pode aumentar a expressão de receptores de quimiocinas como o CXCR4 (HELBIG et al., 2003). Portanto a próxima etapa deste trabalho foi investigar o perfil da expressão do CXCR4 em relação ao estadiamento clínico do câncer de mama e se, de alguma forma, está associada ao aumento de MDA no sangue periférico.

4.5 ANÁLISE MOLECULAR

4.5.1 Integridade do RNA

Para análise da expressão do RNAm do CXCR4, foram previamente avaliadas, através da amplificação do RNAm da β -actina, a integridade do RNA e a viabilidade do DNAc, bem como a possível contaminação das amostras por DNA genômico. Verificou-se que todas as amostras de RNA apresentaram quantidades detectáveis de RNAm de β -actina e integridade aceitável para a amplificação. É possível observar a presença de DNA genômico nas amostras de RNA quando produtos de 573 pb são amplificados. Em todas as amostras foram detectados fragmentos de 353 pb e ausência de fragmentos de 573 pb, demonstrando que o RNA estava íntegro e livre de contaminação por DNA (figura 12).

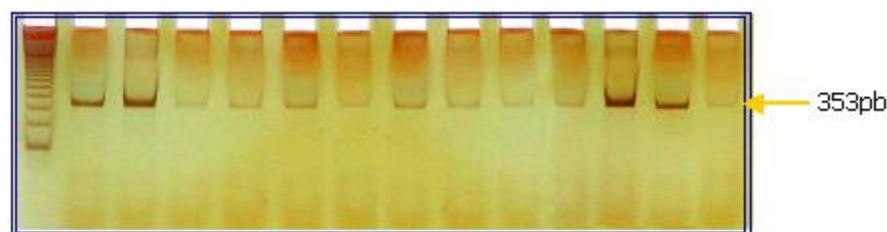


Figura 12 – Expressão do RNAm de β -actina em células totais periférico de amostras de doadoras e pacientes. Análise da integridade do RNA e da viabilidade do DNAc, e verificação da presença de DNA genômico. A amplificação do fragmento de 353 pb indica presença de RNAm β -actina. L – ladder de 100 bp (Invitrogen).

4.5.2 Determinação da Quantidade de DNAc

Para a determinação da quantidade total de DNAc, foi construída uma curva a qual contribuiu para a escolha da quantidade de DNAc baseada nas médias dos valores de CT das duplicatas, conforme a figura 13.

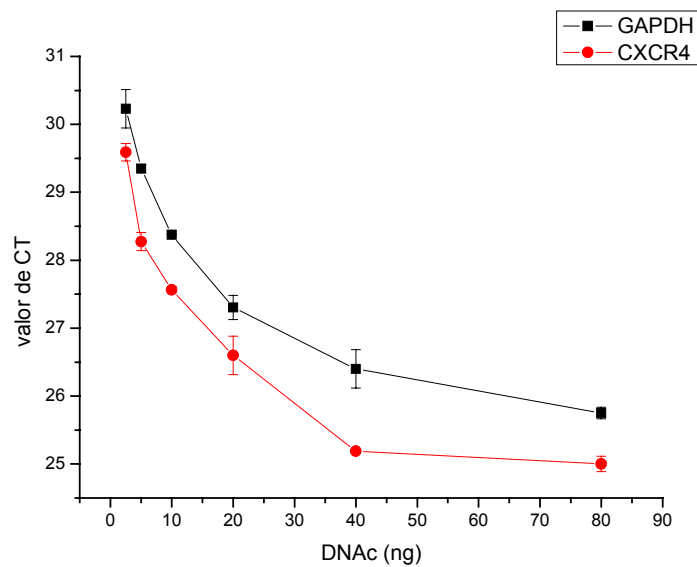


Figura 13 – Determinação da concentração de DNAc. Valores de CT (média de duplicatas) do CXCR4 e GAPDH em relação a quantidades de DNAc total. Determinação da quantidade de DNAc total para a realização da PCR quantitativa para os genes CXCR4 e GAPDH.

Além dos valores de CT utilizados para a determinação da quantidade de DNAc total utilizada, foram considerados os valores de melhor eficiência pelo software *Optical Monitor* (BIO-RAD). Assim sendo, foi determinada a quantidade de DNAc igual a 20 ng baseado nos resultados da curva descrita acima, considerando eficiências e valores de CT (*Cycle Threshold*) das reações. A partir dessas análises, foi utilizada a quantidade de 20 ng de DNAc para a realização da PCR quantitativa para os genes CXCR4 e GAPDH. As seqüências dos primers

utilizados para o GAPDH foram obtidas através do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo, o qual é utilizado rotineiramente para PCR quantitativo nas análises de expressão gênica em células humana. As seqüências dos primers para CXCR4 foram obtidas de acordo com a análise no Software *GeneRunner* (Hasting Software Inc., Nova Iorque, E.U.A.)

A análise da curva de *melting*, cujo protocolo foi descrito em materiais e métodos, revelou a presença de somente um pico, correspondente ao fragmento de CXCR4, na temperatura de 80,5°C, confirmando a especificidade da amplificação, como ilustrado na figura 14.

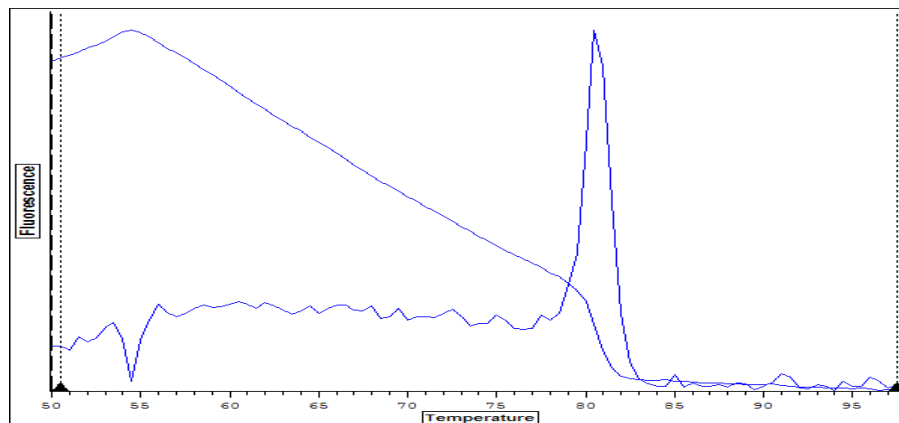


Figura 14 – Perfil da curva de *melting* realizada após amplificação de um fragmento do gene CXCR4 por PCR em tempo real. Verificou-se a presença de um pico na temperatura de 80,5°C, o que confirmou a especificidade da amplificação.

4.5.3 Análise da Expressão do RNAm do CXCR4

Receptores de quimiocinas têm sido implicados na patogênese de várias doenças. Um dos receptores mais estudados é o CXCR4 por ele ser um co-receptor para entrada do HIV (FENG et al., 1996), bem como sua habilidade de mediar o processo de metástase em uma variedade de cânceres (ZLOTNIK, 2006).

A próxima etapa do presente trabalho foi investigar a expressão do RNAm do CXCR4 em células do sangue periférico das doadoras saudáveis e das pacientes com câncer de mama. As análises por PCR em tempo real mostraram que

não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de CXCR4 entre pacientes e grupo controle (3.87 ± 1.05 e 2.76 ± 0.65 , respectivamente) conforme ilustrado na figura 15.

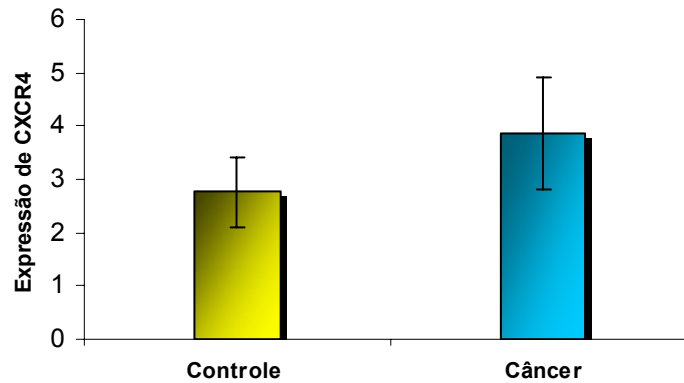


Figura 15 – Expressão do RNAm do CXCR4 em células do sangue periférico de doadoras saudáveis (Controle) e em pacientes com câncer de mama (Câncer).

Em relação à expressão do RNAm de CXCR4 nos diferentes estadiamentos da doença, verificou-se que no estágio II os níveis de RNAm de CXCR4 estavam significativamente ($p < 0,05$) aumentados (5.95 ± 2.05) quando comparados aos do grupo controle (2.76 ± 0.65). Entretanto, a expressão do RNAm do CXCR4 nos estágios I, III e IV (0.83 ± 0.43 , 1.77 ± 0.44 e 1.4 ± 0.25 , respectivamente) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle, como mostrado na figura 16.

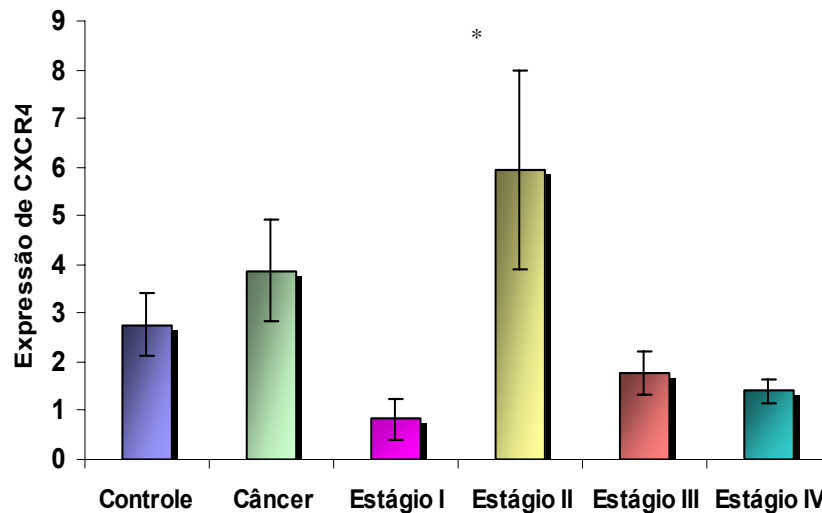


Figura 16 – Expressão do RNAm do CXCR4 em células do sangue periférico de doadoras saudáveis (Controle), em pacientes com câncer de mama (Câncer) e pacientes com câncer de mama distribuídas de acordo com os estágios I, II, III e IV. (* $p < 0.05$).

Diferentemente do amplo conhecimento da expressão das quimiocinas e seus receptores em tecidos tumorais de mama, deve ser considerado que quimiocinas, assim como a maioria das citocinas, age localmente, porém níveis dessas moléculas no sangue periférico poderia ser um reflexo do processo patológico do câncer.

No presente estudo, foi mostrado que não houve diferença estatisticamente significativa da expressão do CXCR4 entre pacientes com câncer de mama (3.87 ± 1.05) e doadoras de sangue saudáveis (2.76 ± 0.65). Entretanto, as amostras pertencentes ao estágio II do câncer de mama apresentaram expressão de CXCR4 significativamente elevada (5.95 ± 2.05) em relação ao controle e aos estágios I, III e IV (0.83 ± 0.43 , 1.77 ± 0.44 e 1.4 ± 0.25 , respectivamente). Uma vez que os maiores níveis de MDA e de expressão de CXCR4 estavam presentes nas pacientes pertencentes ao estadiamento II do câncer, pode-se sugerir que o aumento do MDA no plasma de pacientes poderia estar relacionado com a expressão aumentada de CXCR4 na periferia. Uma vez que, o aumento de MDA foi observado em todos os estadiamentos, pode-se supor que este produto da lipoperoxidação ocorra devido ao processo inflamatório intenso e lesão tecidual.

O acúmulo de ROS, que provoca o aumento da lipoperoxidação e de seus produtos tais como o MDA, pode promover o aumento da transcrição de alguns receptores de quimiocinas. Sacconi et al. (2000), em seu trabalho, mostraram que intermediários reativos do oxigênio (ROI) elevam a expressão de maneira dose-dependente de certos receptores de quimiocinas, como CCR2, CCR5 e CXCR4 em monócitos humanos, e que antioxidantes antagonizam esse efeito, fazendo com que ocorra uma inibição de até 100% na expressão de alguns desses receptores.

No presente trabalho, 84% dos pacientes que apresentaram níveis plasmáticos elevados de MDA ($1.6 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$), apresentaram também aumento de expressão de CXCR4 (9.1 ± 2.6) segundo cálculo de Pfaffl. Pode-se supor que o aumento de MDA, de certa forma, promoveu aumento da expressão do CXCR4.

Egan et al. (2008) mostraram que níveis elevados de CXCR4 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estão positivamente correlacionados com níveis também elevados de células endoteliais progenitoras (EPC). Em diabetes tipo 2, as EPCs estão presentes em poucas quantidades e observa-se que a expressão de CXCR4 nas PBMCs também encontra-se diminuída, o que sugere uma correlação entre os dois eventos. O papel das EPCs na angiogênese é inquestionável (URBICH; DIMMELER, 2004). Um dos estudos investigou a angiogênese tumoral em modelos animais e mostrou que a inibição de VEGF derivado de EPCs bloqueou a angiogênese tumoral (LYDEN et al. 2001). Zhang et al. (2006) estudaram a expressão de SDF-1 e seu receptor CXCR4 em PBMCs de crianças e propuseram que o RNAm do CXCR4 possivelmente está envolvido no desenvolvimento de lesões arteriais coronárias na doença de Kawasaki.

A metástase é a principal causa de morte relacionada ao câncer, porém a disseminação precoce de células tumorais ainda continua indetectável mesmo através de tecnologias de alta resolução. (ALIX-PANABIÈRES et al., 2007).

A capacidade de células tumorais primárias de câncer de mama de disseminarem para a medula óssea ainda está sob investigação, entretanto, já é conhecido que células tumorais expressando em sua membrana receptores de quimiocina da família CXC podem migrar para sítios específicos como o pulmão, fígado e medula óssea (MULLER et al., 2001).

A disseminação do câncer de mama deve envolver uma sucessão de estágios clínicos e patológicos iniciando com o carcinoma *in situ*, progressão para

uma lesão invasiva e o início do processo de metástase. Além disso, acreditou-se durante décadas que células de câncer de mama metastáticas se disseminavam primeiramente para os linfonodos antes de atingir o sangue periférico e sítios distantes, como a medula óssea. Entretanto, já se tornou evidente que a disseminação metastática ocorre em 50% dos casos em que o câncer é aparentemente localizado, e desses pacientes, até 30% que não apresentam metástase para os linfonodos desenvolverão metástases distantes dentro de 5 anos (FISHER et al. 2002, GILBEY et al. 2004, PANTEL; BRAKENHOFF 2004, ZIEGLSCHMID et al. 2005). Portanto, a recorrência provavelmente ocorre devido às micrometástases antes do tratamento primário loco-regional (LACROIX, 2006).

A presença de células malignas no sangue periférico já foi descrita há algumas décadas (PANTEL et al., 2003).

O sangue periférico pode ser uma fonte ideal para a detecção de células tumorais disseminadas (DTCs), por exigir procedimentos simples. (LACROIX, 2006).

A PCR tem sido utilizada para identificar e caracterizar as DTCs através de alterações genéticas (expressão alelo-específica, instabilidade de microsátélites, perda da heterozigose) e epigenéticas (status da metilação) que são especialmente associadas com células cancerígenas (SIDRANSKY, 1997). Entretanto, essa técnica se torna complicada devido ao fato de que existe uma enorme quantidade de variações genéticas entre os tumores (LACROIX et al., 2006). A transcrição reversa (RT)-PCR também utilizada para a detecção de transcritos associados ao câncer de mama é mais sensível que técnicas baseadas no uso de anticorpos, porém, ocorrem resultados falso-positivos em amostras de doadores normais (RING et al., 2004). Para aumentar a sensibilidade e a especificidade, a PCR quantitativa pode ser utilizada para a detecção de DTCs (ZIEGLSCHMID et al. 2005). Ntoulia et al., (2006) utilizaram o método de PCR quantitativo para o RNAm da mamaglobina como marcador de células tumorais na circulação e mostraram sua relevância no prognóstico do câncer de mama. Xenides et al. (2006) também evidenciaram a importância prognóstica da detecção por PCR quantitativo do RNAm da citoqueratina (KRT) presente no sangue periférico de pacientes com câncer de mama.

A detecção das DTCs pode oferecer perspectivas clínicas interessantes como: estimar o prognóstico após a ressecção do tumor, determinar a

necessidade de terapia, monitorar da eficácia da terapia e a recorrência, e destruir DTCs (LACROIX, 2006).

Inúmeros marcadores têm sido utilizados em ensaios para a detecção das DTCs no sangue periférico, incluindo o CXCR4 (ALIX-PANABIÈRES et al., 2005).

O estudo de marcadores nas DTCs é de fundamental importância, pois contribui para a detecção destas células no sangue periférico.

O conhecimento de que células tumorais de mama podem ocasionalmente atingir o sangue periférico em uma fase inicial da doença fornece suporte para a pesquisa buscar novas técnicas e marcadores tumorais capazes de detectar e identificar precocemente células tumorais disseminadas. Dessa forma, seria possível conhecer a probabilidade de metástases e monitorar a resposta dos pacientes ao uso de diversos adjuvantes, o que direcionaria a terapia em cada paciente.

Os níveis de MDA entre as pacientes com câncer de mama foram estatisticamente maiores do que entre as doadoras de sangue saudáveis, o que permite considerar que o estresse oxidativo nessas pacientes ocorreu de forma mais intensa comparado ao grupo controle. Porém, ainda não é esclarecido se o intenso estresse oxidativo nas mulheres contribui para a carcinogênese mamária ou se ele é resultado do processo inflamatório que pode ocorrer durante a patogênese do câncer. Entretanto, com essas evidências é possível sugerir que uso de substâncias antioxidantes poderia ter efeito preventivo e/ou terapêutico em relação ao câncer de mama;

Os níveis de MDA nos diferentes estadiamentos do câncer de mama mostraram-se estatisticamente elevados somente nos estágios II e III quando comparados ao controle. Não foi possível verificar se o nível de estresse oxidativo e MDA poderia estar relacionado com a progressão da doença uma vez que o número de amostras nos estágios I e IV foi pequeno;

A expressão do RNAm do CXCR4 nas células do sangue periférico nas pacientes com câncer de mama foi maior que o controle, porém esse valor não foi estatisticamente significativo;

A expressão do RNAm do CXCR4 nas células do sangue periférico de pacientes pertencentes ao estadiamento II apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparou-se com o grupo controle. Sabendo-se que a metástase

é a principal causa de morte relacionada ao câncer, porém a disseminação precoce de células tumorais ainda continua indetectável mesmo através de tecnologias de alta resolução, esse resultado sugere que o CXCR4 periférico pode pertencer a células tumorais disseminadas na circulação e que poderia ser utilizado como um indicador do início do processo de metástase, uma vez que no estágio III as pacientes já apresentam metástases.

Uma vez que os maiores níveis de MDA e de expressão de CXCR4 estavam presentes nas pacientes pertencentes ao estadiamento II do câncer, pode-se sugerir que o aumento do MDA no plasma de pacientes poderia estar relacionado com a expressão aumentada de CXCR4 na periferia. Uma vez que, o aumento de MDA foi observado em todos os estadiamentos, pode-se supor que este produto da lipoperoxidação ocorra devido ao processo inflamatório intenso e lesão tecidual. Seriam necessários mais estudos com o objetivo de verificar se o aumento do CXCR4 na circulação é resultante da sua possível regulação através do MDA, ou se ocorre devido à presença de grande quantidade de células tumorais nesse estágio ou, ainda, se é resultante da resposta de ambos os eventos concomitantes.

5 CONCLUSÃO

- RNAm do CXCR4 periférico poderia pertencer a células tumorais disseminadas na circulação;
- o CXCR4, bem como o MDA, poderiam ser utilizados como indicadores na patogênese do câncer de mama;
- no presente trabalho, 84% das pacientes que apresentaram níveis plasmáticos elevados de MDA apresentaram também aumento de expressão de CXCR4. Esse dado sugere uma possível relação entre essas moléculas o que merece futuras investigações.

REFERÊNCIAS

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48(1): 113-31, 2002.

AIUTI, A.; WEBB, I.J.; BLEUL, C.; SPRINGER, T.; GUTIERREZ-RAMOS, J.C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. **J. Exp. Med.**, 185: 111-120, 1997.

AL MEHDI, A.B.; DODIA, C.; JAIN, M.K.; FISHER, A.B. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biophys. Biochim. Acta**, 1166: 56-62, 1993.

ALI, S.; LAZENNEC, G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, 26: 401-420, 2007.

ALIX-PANABIÈRES, C. ; BROUILLET, J.P.; FABBRO, M.; YSSEL, H.; ROUSSET, T. ; MAUDELONDE, T.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G.; VENDRELL, J.P. Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. **J. Immunol. Methods.**, 299:177-88, 2005.

ALIX-PANABIÈRES, C.; MÜLLER, V.; PANTEL, K. Current status in human breast cancer micrometastasis. **Curr. Opin. Oncol.**, 19(6): 558-563, 2007.

ARPINO, G.; BARDOU, V.J., CLARK, G.M.; ELLEDGE, R.M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Res.**, 6:149-156, 2004.

AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V. Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 11(1): 1-15 , 2008.

BAE, Y.; KANG, S.; SEO, M.; BAINES, I.C.; TEKLE, E.; CHOCK, P.C.; RHEE, S.G. Epidermal growth factor-induced generation of hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.**, 272(1): 217-221, 1997.

BAEUERLE, P.A. I κ B - NF- κ B structures: at the interface of inflammation control. **Cell**, 95: 729-731, 1998.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J. Intern. Med.**, 250: 91-104, 2001.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. **Adv Immun**, 55: 97-179, 1994.

BALKWILL, F. The significance of cancer cell expression on the chemokine receptor CXCR4. **Semin. Cancer Biol.**, 14: 171-179, 2004.

BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharm.**, 34(9): 26-35, 1994.

BARKER, K. Na Bancada. Trad. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BEAHR, O.H.; CARR, D.T.; RUBIN, P. **Manual for Staging of Cancer**. Philadelphia: Lippincott, 1977.

BELPERIO, J.A.; KEANE, M.P.; ARENBERG, D.A.; ADDISON, C.L.; EHLERT, J.E.; BURDICK, M.D.; STRIETER, R.M. CXC chemokines in angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, 68: 1-8, 2000.

BENBOUBKER, L.; WATIER, H.; CARION, A.; GEORGET, M.T.; DESBOSIS, I.; COLOMBAT, P.; BARDOS, P.; BINET, C.; DOMENECH, J. Association between the SDF1-3'A allele and high levels of CD34⁺ progenitor cells mobilized into peripheral blood in humans. **Br. J. Haematol.**, 113: 247-250, 2001.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of cases, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, 47: 233-261, 1996.

BORST, M.J.; INGOLD, J.A. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. **Surgery** 114(4): 637-642, 1993.

BRADLEY, J. R.; JOHNSON, D. R.; J. S. POBER. Endothelial activation by hydrogen peroxide selective increases intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class-1. **Am. J. Pathol.**, 142: 1598-1609, 1993.

BUMPERS, H.L.; HASSETT, J.M., Jr.; PENETRANTE, R.B.; HOOVER, E.L.; HOLYOKE, E.D. Endocrine organ metastases in subjects with lobular carcinoma of the breast. **Arch. Surg.**, 128: 1344-47, 1993.

BURGER, J.A.; KIPPS, T.J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, 107: 1761-67, 2006.

CANCER RESEARCH UK. Breast cancer incidence statistics by age. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/breast/incidence/>>. Acesso em Maio de 2008.

CARBONNEAU, M.A.; PEUCHANT, E.; SESS, D.; CANIONI, P.; CLERC, M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. **Clin. Chem.** 37(8): 1423-9, 1991.

CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**, 50(2): 360-367, 2006.

CAVASSIN, G.G.O.; DE LUCCA, F.L.; ANDRÉ, N.D.; COVAS, D.T.; FUNGARO, M.H.P.; VOLTARELLI, J.C.; WATANABE, M.A.E. Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil. **Blood Cells Mol. Dis.**, 33: 90-93, 2004.

CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C.; MACDONALD, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Rev. Cancer**, 2: 563-572, 2002.

CHENSUE; STEPHEN, W. Molecular Machinations: Chemokine Signals in Host-Pathogen Interactions. **Clin. Microbiol. Rev.**, 4: 821-835, 2001.

CHIRICO, S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. **Methods Enzymol.**, 233: 314-318, 1994.

CHIRICO, S.; SMITH, C.; MARCHANT, C.; MITCHINSON, M.J.; HALLIWELL, B. Lipid peroxidation in hyperlipidemic patients. A study of plasma using a HPLC-based thiobarbituric acid test. **Free Radical Res. Comm.**, 19(1): 51-57, 1993.

CHISOLM, G.M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: An overview. **Free Radical Biology and Medicine**, 28: 1815-26, 2000.

CIGHETTI, G.; DEBIASI, S.; PARONI, R.; ALLEVI, P. Free and Total Malondialdehyde Assessment in Biological Matrices by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: What Is Needed for an Accurate Detection. **Anal. Biochem.**, 266(2): 222-229, 1999.

CORDIS, G.A.; MAULIK, N.; BAGCHI, D.; ENGELMAN, R.M.; DAS, D.K. Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 632(1-2):97-103, 1993.

DEL RIO, D.; STEWART, J.A. A review of recent studies on MDA as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, 15(4): 316-28, 2005.

DIAB, S.G.; ELLEDGE, R.M.; CLARK, G.M. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 92: 550-556, 2000.

DIXON, A.R.; ELLIS, I.O.; ELSTON, C.W.; BLAMEY, R.W. A comparison of the clinical metastatic patterns of invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. **Br. J. Cancer**, 63: 634-635, 1991.

EGAN, C.G.; LAVERY R.; CAPORALI, F.; FONDELLI, C.; LAGHI-PASINI, F.; DOTTA, F.; SORRENTINO, V. Generalised reduction of putative endothelial progetitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. **Diabetologia**, 51(7): 1296-305, 2008.

EKSTROM, T.; GARBERG, P.; EGESTAD, B.; HOGERG, J. Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography. **Chem. Biol. Interact.**, 66(3-4): 177-187, 1988.

ERKKO, H.; PYLKÄS, K.; KARPPINEN, S.M.; WINQVIST, R. Germline alterations in the CLSPN gene in breast cancer families. **Cancer Lett.**, 261(1): 93-97, 2008.

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biol. Med.**, 13: 341-390, 1992.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, 11(1):81-128, 1991.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767, 1990.

FENG, Y.; BRODER, C.C.; KENNEDY, P.E.; BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, 272(5263): 872-877, 1996.

FISHER, B.; JEONG, J.H.; ANDERSON, S.; BRYANT, J.; FISHER, E.R.; WOLMARK, N. Twenty-five year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. **New England Journal of Medicine**, 347: 567-575, 2002.

FOLGER, S.G.; MCDONALD, J.A.; SIMON, M.S.; STROM, B.L.; WINGO, P.A.; SPIRTAS, R. Relation of regimens of combined hormone replacement therapy to lobular, ductal, and other histologic types of breast carcinoma. **Cancer**, 95: 2455-64, 2002.

FORSTER, R.; SCHUBEL, A.; BREITFELD, D.; KREMMER, E.; RENNER-MULLER, I.; WOLF, E.; LIPP, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell.**, 99: 23-33, 1999.

FRIEDENREICH, C.M. Review of anthropometric factors and breast cancer risk. **Eur. J. Cancer Prev.**, 10: 15-32, 2001.

FRIEDENSON, B. BRCA1 and BRCA2 Pathways and the Risk of Cancers Other Than Breast or Ovarian. **MedGenMed**, 7(2): 60, 2005.

FUKUNAGA, K.; TAKAMA, K.; SUZUKI, T. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Plasma Malondialdehyde Level without a Solvent Extraction Procedure. **Anal. Biochem.** 230(1) 20-23, 1995.

GAWE, S.; WARDAS, M.; NIEDWOROK, E. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiad. Lek.**, 57(9-10): 453-455, 2004.

GERLI, G.; VANELLI, C.; TURRI, O.; ERARIO, M.; GARDELLINI, A.; PUGLIANO, M.; BIONDI, M.L. SDF1-3'A Gene Polymorphism Is Associated with Chronic Myeloproliferative Disease and Thrombotic Events. **Clin. Chem.**, 51: 2411-14, 2005.

GILBEY, A.M.; BURNETT, D.; COLEMAN, R.E.; HOLEN, I. The detection of circulating breast cancer cells. **Journal of Clinical Pathology** 57: 903-911, 2004.

GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, 40(2): 131-152, 1995.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, 104: 503–516, 2001.

GÖNENÇ, A.; ÖZHAN, Y.; TORUM, M.; SIMSEK, B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. **J Clin. Pharm. Ther.**; 26: 141-144, 2001.

GREENLEE, R.T.; MURRAY, T.; BOLDIN, S.; WINGO, P. Cancer statistics 2000. **CA Cancer J. Clin.**, 50: 7-33, 2000.

GUYTON, K.Z.; KENSLER, T.W. Oxidative mechanism in carcinogenesis. **British Medical Bulletin**, 49: 523-44, 1993.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American J. Clin. Nutrition**. 57(5): 715S-725S. 1993.

HAN, K.H.; HONG, K.H.; KO, J.; RHEE, K.S.; HONG, M.K.; KIM, J.J.; KIM, Y.H.; PARK, S.J. Lysophosphatidylcholine up-regulates CXCR4 chemokine receptor expression in human CD4 T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, 76(1): 195-202, 2004.

HARRIS JR, LIPPMAN ME, VERONESI U, WILLETT W. Breast Cancer. **New Engl. J. Med.**, 327: 319-328, 1992.

HELBIG, G.; CHRISTOPHERSON, K.W.; BHAT-NAKSHATRI, P.; KUMAR, S.; KISHIMOTO, H.; MILLER, K.D.; BROXMEYER, H.E.; NAKSHATRI, H. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. **J. Biol. Chem.**, 278(24): 21631-8, 2003.

HOLLAND, J.D.; KOCHETKOVA, M.; AKEKAWATCHAI, C.; DOTTORE, M.; LOPEZ, A.; MCCOLL, S.R. Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. **Cancer Res.**, 66: 4117-4124, 2006.

HUANG, Y.L.; SHEU, J.Y.; LIN, T.H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. **Clin. Biochem.**, 32: 131-6, 1999.

IARC: WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs: Programme finds combined estrogen-progestogen contraceptives and menopausal therapy are carcinogenic to humans. 2005. Disponível em: <www.iarc.fr/ENG/Press_Releases/pr167a.html>. Acesso em Maio de 2008.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. 2004 Disponível em: <http://www.inca.gov.br/releases/press_release_view.asp?ID=1575>. Acesso em Maio de 2008.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. 2007 Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> Acesso em Maio de 2008.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med.**, 9(6): 515-540, 1990.

KAHLENBORN, C.; MODUGNO, F.; POTTER, D.M.; SEVERS, W.B. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. **Mayo Clin. Proc.**, 81(10): 1290-1302, 2006.

KAKINUMA, T.; HWANG, S.T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. **J. Leukoc. Biol.**, 79: 639-651, 2006.

KALEMKERIAN, G.P.; JIROUTEK, M.; ETTINGER, D.S.; DORIGHI, J.A.; JOHNSO; KAMANGAR, F.; DORES, G.M.; ANDERSON, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, 158: 2137-50, 2006.

KAMANGAR, F.; DORES, G.M.; WILLIAM F. ANDERSON, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, 24(14): 2137-50, 2006.

KANG, H.; MANSEL, R.E.; JIANG, W.G. Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. **Int. J. Oncol.**, 26(5): 1429-34, 2005.

KAWAI, S.; KASASHIMA, K.; TOMITA, M. High-performance liquid chromatographic determination of malondialdehyde in serum. **J. Chromatogr.**, 495: 235-238, 1989.

KETTERHAGEN, J.P.; QUAKENBUSH, S.R.; HAUSHALTER, R.A. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, 158: 120-123, 1984.

KHANZODE, S.S.; MUDDESHWAR, M.G.; KHANZODE, S.D.; DAKHALE, G.N. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. **Free Radic. Res.**, 38(1): 81-85, 2004.

KOCK, H.A.; PEIXOTO, J.E.; NEVES, A.L.E. Análise da infra-estrutura para a mamografia. **Radiol. Bras.**, 33:23-9, 2000.

KOTSOPOULOS, J.; OLOPADE, O.I.; GHADIRIAN, P.; LUBINSKI, J.; LYNCH, H.T.; ISAACS, C.; WEBER, B.; KIM-SING, C.; AINSWORTH, P.; FOULKES, W.D., EISEN, A.; SUN, P.; NAROD, S.A. Changes in body weight and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Research**, 7: 833-843, 2005.

KUMAR, K.; THANGARAJU, M.; SACHDANANDAM, P. Changes observed in antioxidant system in the blood of postmenopausal women with breast cancer. **Biochemistry International**, 25: 371-376, 1991.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; KABALIMOORTHY, J.; NAGINI, S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. **Clin. Biochem.**, 35:275-279, 2002.

LACROIX, M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. **Endocrine-Related Cancer**, 13: 1033-67, 2006a.

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ G. P53 and breast cancer: an update. **Endocrine-Related Cancer** 13: 293-325, 2006b.

LAMBE, M.; HSIEH, C.C.; CHAN, H.W.; EKBOM, A.; TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H.O. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. **Breast Cancer Research and Treatment**. 38: 305-311, 1996.

LAPTEVA, N.; YANG, A.G.; SANDERS, D.E.; STRUBE, R.W.; CHEN, S.Y. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. **Cancer Gene Ther.**, 12: 84-89, 2005.

LARGILLIERE, C.; MELANCON, S.B. **Anal. Biochem.**, 170: 123-126, 1988.

LEE, J.S.; KAHN, S.S.; CULBRETH, R.; COOPER, A.D., Jr. Modulation of monocyte chemokine production and nuclear factor kappa B activity by oxidants. **J. Interferon Cytokine Res.**, 19: 761-767, 1999.

LI, C.I.; ANDERSON, B.O.; DALING, J.R.; MOE, R.E. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. **J. Am. Med. Assoc.**, 289: 1421-24, 2003.

LI, C.I.; ANDERSON, B.O.; PORTER, P., HOLT, S.K., DALING, J.R.; MOE, R.E. Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. **Cancer**, 88: 2561-2569, 2000a.

LI, C.I.; WEISS, N.S.; STANFORD, J.L.; DALING, J.R. Hormone replacement therapy in relation to risk of lobular and ductal breast carcinoma in middle-aged women. **Cancer** 88: 2570-2577, 2000b.

LIU R, WANG X, CHEN GY, DALERBA P, GURNEY A, HOEY T, SHERLOCK G, LEWICKI J, SHEDDEN K, CLARKE MF. The Prognostic Role of a Gene Signature from Tumorigenic Breast-Cancer Cells. **The New England Journal of Medicine**, 356(3): 217-26, 2007.

LO, Y.Y.; CRUZ, T.F. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. **J. Biol. Chem.**, 270(20): 11727-30, 1995.

LOS, M.; SCHENK, H.; HEXEL, K.; BAEUERLE, P.A.; DROGE W., SCHULZE-OSTHOFF K. IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. **EMBO. J.**, 14: 3731-3740, 1995.

LUKER, K.E.; LUKER, G.D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. **Cancer Letters**, 238: 30-41, 2006.

LUSTER, A D (1998). Mechanisms of Disease: Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal Medicine**, 38: 436-45.

LUSTER, A.D.; GRENBERG, S.M.; LEDER, P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. **J. Exp. Med.**, 182: 219-31, 1995.

LYDEN, D.; HATTORI, K.; DIAS, S.; COSTA, C.; BLAIKIE, P.; BUTROS, L.; CHADBURN, A.; HEISSIG, B.; MARKS, W.; WITTE, L.; WU, Y.; HICKLIN, D.; ZHU, Z.; HACKETT, N.R.; CRYSTAL, R.G.; MOORE, M.A.; HAJJAR, K.A.; MANOVA, K.; BENEZRA, R.; RAFII, S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. **Nat Med.**, 7: 1194–1201, 2001.

MA, Q.; JONES, D.; BORGHESANI, P.R.; SEGAL, R.A.; NAGASAWA, T.; KISHIMOTO, T.; BRONSON, R.T.; SPRINGER, T.A. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. **Proc. Natl Acad. Sci.**, 95: 9448-9453, 1998.

MAEDA, H.; AKAIKE, T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. **Biochemistry**, 63: 854-865, 1998.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. **Mut. Res.**, 424: 83-95, 1999.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **J. Chromatog. B.**, 827: 76-82, 2005.

MCCARTHY, E. P.; BURNS, R.B.; FREUND, K.M.; ASH, A.S.; SHWARTZ, M.; MARWILL, S.L.; MOSKOWITZ, M.A. Mammography use, breast cancer stage at diagnosis, and survival among older women. **J. Am. Geriatr. Soc.**, 48(10): 1226-1233, 2000.

MEYER, M.; PAHL, H.L.; BAEUERLE, P.A. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. **Chem. Biol. Interact.**, 91: 91-100, 1994.

MORIEL, P.; OKAWABATA, F.S.; ABDALLA, D.S.P. Oxidized lipoproteins in blood plasma: possible marker of atherosclerosis progression. **Life**, 48: 413-417, 1999.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M.E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S.N.; BARRERA, J.L.; MOHAR, A.; VERASTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410: 50-56, 2001.

NAGASAWA, T.; HIROTA, S.; TACHIBANA, K.; TAKAKURA, N.; NISHIKAWA, S.; KITAMURA, Y.; YOSHIDA, N.; KIKUTANI, H.; KISHIMOTO, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, 382(6592): 636-638, 1996.

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

NEWSTEAD, G.M.; BAUTE, P.B.; TOTH, H.K. Invasive lobular and ductal carcinoma: mammographic findings and stage at diagnosis. **Radiology** 184: 623-627, 1992.

NTOULIA M, STATHOPOULOU A, IGNATIADIS M, Malamos, N.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V.; Lianidou, E.S. Detection of mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. **Clin Biochem.**, 2006; 39:879-887.

OHL, L.; MOHAUPT, M.; CZELOTH, N.; HINTZEN, G.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; BLANKENSTEIN, T.; HENNING, G.; FORSTER, R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity.**, 21:279-288, 2004.

OSTEEN, R.T. Breast cancer. In: LENHARD, R.E.; OSTEEN, R.T.; GANSLER, T. editors. Clinical oncology. Atlanta (GA): American Cancer Society, 251-68, 2001.

PALINSKI, W.; ROSENFELD, M. E.; YLA-HERTTUALA, S.; GURTNER, G. C.; SOCHER, S. S.; BUTLER, S.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modifications in vivo. **N. Engl. J. Med.**, 320: 915–924, 1989.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R.H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature Reviews Cancer**, 4: 448-456, 2004.

PANTEL, K.; MÜLLER, V.; AUER, M.; NUSSER, N.; HARBECK, N.; BRAUN, S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, 9(17): 6326-34, 2003.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S. Cancer burden in the year 2000. **The global picture European Journal of Cancer**, 37: 4-66, 2001.

PELED, A.; HARDAN, I.; TRAKHTENBROT, L.; GUR, E.; MAGID, M.; DARASH-YAHANA, M.; COHEN, N.; GRABOVSKY, V.; FRANITZA, S.; KOLLET, O.; LIDER, O.; ALON, R.; RECHAVI, G.; LAPIDOT, T. Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. **Stem cells**, 20: 259-266, 2002.

PELUS, L.M.; HOROWITZ, D.; COOPER, S.C., KING, A.G. Peripheral blood stem cell mobilization: A role for CXC chemokines. **Critic. Rev. Oncol. Hematol.**, 43: 257-75, 2002.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, 29(9):45, 2001.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B**, 742: 315-325.

POLIDORI, M.C.; SAVINO, K.; ALUNNI, G.; FREDDIO, M.; SENIN, U.; SIES, H.; STAHL, W.; MECOCCI, P. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. **Free Radic. Biol. Med.** 32(2): 148-52, 2002.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, 117(11): 3155-63, 2007.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, (4):277-290, 1995.

RAY, G.N.; SHAHID, M.; HUSAIN, S.A. Effect of nitric oxide and malondialdehyde on sister-chromatid exchanges in breast cancer. **Br. J. Biomed. Sci.**, 58(3): 169-76, 2001.

RAY, G.; BATRA, S.; SHUKLA, N.K. Lipid peroxidation, free radical. and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, 59:163–170, 2000.

RAZMKHAH, M.; TALEI, A.R.; DOROUDCHI, M.; KHALILI-AZAD, T.; GHADERI, A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. **Cancer Lett.**, 225: 261-266, 2005.

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

RING, A.; SMITH, I.E.; DOWSETT, M. Circulating tumour cells in breast cancer. **Lancet Oncology**, 5 79-88, 2004.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, 174(3): 101503, 2006.

ROMERO, F.J.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, M.J.; ROMERO, B.; MARIN, N.; ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ. Health Perspect.**, 106: 1229-1234, 1998.

ROSS, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, 362: 801-809, 1993.

RUSSO, I.H.; RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. **Environ. Health Perspect.**, 4(4): 938-967, 1997.

RUSSO, J.; MORAL, R.; BALOGH, G.A.; MAILLO, D.; IRMA; RUSSO, I.H. The protective role of pregnancy in breast cancer. **Cancer Research**, 7: 131-142, 2005.

RUSSO, J.; TAY, L.K.; RUSSO, I.H. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**. 2: 5-73, 1982.

SACCANI, A.; SACCANI, S.; ORLANDO, S.; SIRONI, M.; BERNASCONI, S.; GHEZZI, P.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Redox regulation of chemokine receptor expression. **PNAS**, 97(6): 2761-2766, 2000.

SAKAI, T.; HABIRO, A.; KAWAHARA, S. High-performance liquid chromatographic determination of 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct in fish meat. **J. Chromatogr. B.**, 726(1-2): 313-316, 1999.

SARAFI, M.N.; GARCIA-ZEPEDA, E.A.; MACLEAN, J.A.; SHARO, I.F.; LUSTER, A.D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **J. Exp. Med.**, 185: 99-109, 1997

SASTRE-GARAU, X.; JOUVE, M.; ASSELAIN, B.; VINCENT-SALOMON, A.; BEUZEBOC, P.; DORVAL, T.; DURAND, J.C.; FOURQUET, A.; POUILLART, P. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. **Cancer**, 77: 113-120, 1996.

SCHMID, B.; RUDAS, M.; RESNICZEK, G.; LEODOLTER, S.; ZEILLINGER, R. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. **Breast Cancer Res. Treat.**, 84: 247-250, 2004.

SCHROPPEL, B.; FISCHEREDER, M.; ASHKAR, R.; LIN, M.; KRAMER, B.K.; MARDERA, B.; SCHIANO, T.; MURPHY, B. The impact of polymorphisms in chemokine and chemokine receptors on outcomes in liver transplantation. **Ame. J. Transplant.**, 2: 640-645, 2002.

SENER, D.E.; GÖNENÇ, A.; AKINCI, M.; TORUN, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. **Cell Biochem. Funct.**, 25(4): 377-82, 2007.

SHI, M.M.; GODLESKI, J.J.; PAULAUSKIS, J.D. Regulation of macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA by oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, 271: 5878-83, 1996.

SIDRANSKY, D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. **Science**, 278: 1054-1059, 1997.

SILVERSTEIN, M.J.; LEWINSKY, B.S.; WAISMAN, J.R.; GIERSON, E.D.; COLBURN, W.J.; SENOFKY, G.M.; GAMAGAMI, P. Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? **Cancer**, 73: 1673-1677, 1994.

SINGH, S.; SADANANDAM, A.; SINGH, R.K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis. Rev.**, 26: 453-467, 2007.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C.H. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 6° ed. New York: John Wiley & Sons, INC., 2002.

SUN, Y.; OBERLEY, L. Redox regulation of transcription activators. **Free Radical Biol. Med.**, 21: 335, 1996.

SUTTNAR, J.; CERMAK, J.; DYR E. Solid-Phase Extraction in Malondialdehyde Analysis. **Anal. Biochem.**, 249(1): 20-23, 1997.

SUTTNAR, J.; MASOVA, L.; DYR, E. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, 751(1): 193-119, 2001.

TAS, F.; HANSEL, H.; BELCE, A.; ILVAN, S.; ARGON, A.; CAMLICA, H.; TOPUZ, E. Oxidative stress in breast cancer. **Med. Oncol.** 22(1): 11-15, 2005.

TASHIRO, K.; TADA, H.; HEILKER, R.; SHIROZU, M.; NAKANO, T.; HONJO, T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. **Science**, 261: 600-603, 1993.

TAY, L.K.; RUSSO, J. Formation and removal of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-nucleic acid adducts in rat mammary epithelial cells with different susceptibility to carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 2: 1327-33, 1981.

THANGARAJU, M.; VIJAYAKALAKSHMI, T.; SACHDANANDAM, P. Effect of tamoxifen on lipid peroxide and antioxidative system in postmenopausal women with breast cancer. **Cancer**, 74: 73-82, 1994.

TIENSIWAKUL, P. Stromal cell-derived factor (SDF) 1-3'A polymorphism may play a role in resistance to HIV-1 infection in seronegative high-risk Thais. **Intervirology**, 47: 87-92, 2004.

TOIKKANEN, S.; PYLKKANEN, L.; JOENSUU, H. Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. **Br. J. Cancer** 76: 1234-40, 1997.

TORUN, M.; GÖNENÇ, A.; YARDIM, S.; SARGIN, H.; MENEVŞE, A.; ŞİMŞEK B. Serum malondialdehyde (MDA), vitamin E and b-carotene levels in breast cancer. **Pharmaceutical Sciences**, 1, 63-65, 1995.

TORUN, M.; YARDIM, S.; GÖNENÇ, A.; SARGIN, H.; MENEVŞE, A.; ŞİMŞEK, B. Serum b-carotene, vitamin E, vitamin C and malondialdehyde levels in several types of cancer. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 20: 259-263, 1995.

UICC Committee on Clinical Stage Classification and Applied Statistics. **Clinical Stage Classification and Presentation of Results, Malignant Tumors of the Breast and Larynx**. Paris: International Union Against Cancer; 1958.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. **Circ. Res.**, 95: 343-353, 2004.

VACA, C.E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mut. Res.**, 195: 137-149, 1988.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, 7(9): 659-72, 2007.

VERHASSELT, V.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F. Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, 28: 3886-90, 1998.

VERKOOIJEN, H.M., FIORETTA, G., VLASTOS, G., MORABIA, A., SCHUBERT, H., SAPPINO, A.P., PELTE, M.F., SCHAFFER, P., KURTZ, J., BOUCHARDY, C. (2003). Important increase of invasive lobular breast cancer incidence in Geneva, Switzerland. **Int. J. Cancer** 104:, 778-781.

VICARI, A.P.; AIT-YAHIA, S.; CHEMIN, K.; MUELLER, A.; ZLOTNIK, A.; CAUX, C. Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. **J. Immunol.**, 165: 1992-2000, 2000.

VOLGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetic**, 9: 138-141, 1993.

VOLPI, N.; TARUGI, P. Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. **J. Chromatogr. B.**, 713(2): 433-437, 1998.

WADA, T.; TOMOSUGI, N.; NAITO, T.; YOKOYAMA, H.; KOBAYASHI, K.; HARADA, A.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. **J. Exp. Med.**, 180: 1135-1140, 1994.

WALZ, A.; PEVERI, P.; ASCHAUER, H.; BAGGIOLINI, M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 149:755-761, 1987.

WALZ, A.; DEWALD, B.; VON TSCHARNER, V.; BAGGIOLINI, M. Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. **J. Exp. Med.**, 170: 1745-50, 1989.

WATANABE, M.A.E.; CAVASSIN, G.G.O.; ORELLANA, M.D.; MILANEZI, C.M.; VOLTARELLI, J.C.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T. SDF-1 gene polymorphisms and syncytia induction in Brazilian HIV-1 infected individuals. **Microbial. Pathog.**, 35: 31-34, 2003.

WENDT, M.K.; COOPER, A.N.; DWINELL, M.B. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. **Oncogene**, 27:1461-1471, 2008.

WHITE, B.N.; DE LUCCA, F.L. Preparation; Analysis of RNA. In: **Analytical Biochemistry of Insects**, Turner, R.B. (ed.). Elsevier, Amsterdam, Capítulo 3, pp. 85, 1977.

WINCHESTER, D.J., CHANG, H.R., GRAVES, T.A., MENCK, H.R., BLAND, K.I., WINCHESTER, D.P. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. **J. Am. Coll. Surg.**, 186: 416-422, 1998.

WINKLER, C.; MODI, W.; SMITH, M.W.; NELSON, G.W.; WU, X.; CARRINGTON, M.; DEAN, M.; HONJO, T.; TASHIRO, K.; YABE, D.; BUCHBINDER, S.; VITTINGHOFF, E.; GOEDERT, J.J.; O'BRIEN, T.R.; JACOBSON, L.P.; DETELS, R.; DONFIELD, S.; WILLOUGHBY, A.; GOMPERS, E.; VLAHOV, D.; PHAIR, J.; O'BRIEN, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. **Science**, 279: 389-393, 1998.

WOLPE, S.D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; HESSE, D.G.; NGUYEN, H.T.; MOLDAWER, L.L.; NATHAN, C.F.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. **J. Exp. Med.**, 167: 570-581, 1988.

World Health Organization. Cancer. Fact sheet n°o 297, 2006. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs295/en/print.html>. Acesso em Maio de 2008.

XENIDIS, N.; PERRAKI, M.; KAFOUSI, M.; APOSTOLAKI, S.; BOLONAKI, I.; STATHOPOULOU, A.; KALBAKIS, K.; ANDROULAKIS, N.; KOUROUSSIS, C.; PALLIS, T.; CHRISTOPHYLAKIS, C.; ARGYRAKI, K.; LIANIDOU, E.S.; STATHOPOULOS, S.; GEORGOULIAS, V.; MAVROUDIS, D. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. **J. Clin. Oncol.** 2006; 24:3756–3762.

YEATMAN, T.J.; CANTOR, A.B.; SMITH, T.J.; SMITH, S.K.; REINTGEN, D.S.; MILLER, M.S.; KU, N.N.; BAEKEY, P.A.; COX, C.E. Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. **Ann. Surg.**, 222: 549-561, 1995.

YEO, H. C.; HELBOCK, H. J.; CHYU, D. W.; AMES, B. N. Assay of Malondialdehyde in Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Anal. Biochem.**, 220(2): 391-396, 1994.

YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proc. Natl. Aca. Sci.**, 84: 9233-7, 1987.

ZHANG, J.; GUI, Y.H.; YANG, Y. Expression of plasma SDF-1 and its receptor CXCR4 in peripheral blood mononuclear cells of children with Kawasaki disease. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.**, 8(4): 283-6, 2006.

ZIEGLSCHMID, V.; HOLLMANN, C.; BÖCHER, O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 42: 155-196, 2005.

ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. **Contrib. Microbiol.**,13:191-9, 2006.

ANEXO

PLASMA MALONDIALDEHYDE (MDA) LEVELS AND CXCR4 EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD CELLS OF BREAST CANCER PATIENTS

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common neoplasms in women and is a leading cause of cancer related deaths worldwide. Chemokines and their receptors are involved in the control of lymphocyte traffic, a critical component of systemic immunity. CXCR4 mRNA could be involved in the development of variety of diseases. Lipid peroxidation, the result of nonenzymatic autooxidation of polyunsaturated fatty acids, presents numerous harmful effects on biological systems and has been implicated in diseases like cancer. This study examined CXCR4 mRNA expression in peripheral blood cells and malondialdehyde (MDA) in plasma from blood donors and breast cancer patients. CXCR4 expression in peripheral blood cells from 59 breast cancer patients and 84 healthy blood donors was analyzed by real-time PCR. Plasma MDA was analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC). In all stages, MDA levels in total breast cancer patients (1.41 ± 0.11) were significantly higher ($p < 0.0001$) than those in healthy subjects (0.34 ± 0.03). No statistically significant difference occurred between CXCR4 expression in peripheral blood cells from breast cancer patients (3.87 ± 1.05) and the normal healthy control group (2.76 ± 0.65). However, stage II samples differed statistically (5.95 ± 2.05) from control (2.76 ± 0.65). Since, high MDA levels and CXCR4 expression was observed in stage II of breast cancer patients, plasma MDA may play a critical role in increase of CXCR4 RNAm in peripheral blood cells of breast cancer patients.

Keywords: CXCR4. Malondialdehyde. Breast cancer.

INTRODUCTION

Current understanding of the role of several cancer risk factors is more comprehensive, as reported for a number of sites, including the brain, colon, breasts and ovaries. Despite such advances, the incidence of breast cancer continues to increase worldwide.

Analysis of data obtained by Sener et al., (2007) showed that lower total antioxidant capacity and higher malondialdehyde (MDA) levels increased oxidative stress and could be related to breast cancer.

MDA is one of the results of lipid peroxidation (GÖNENÇ et al, 2001) and, in the last few years, it has come to be considered the main indicator of lipoperoxidative processes (GAWE et al, 2004); thus justifying the studies concerning its role as an indicator of oxidative stress (DEL RIO et al, 2005) and a precursor of endothelial disorder (POLIDORI et al, 2002).

Studies have shown that the regulation of CXCR4 mRNA expression depends on cell activation and oxidative stress, as well as cell type (CARUZ et al., 1998; SACCANI et al, 2000). Furthermore, signaling and internalization of the CXCR4 protein can be regulated by receptor phosphorylation dependent and independent mechanisms (HARIBABU et al., 1997).

Approximately 50 human chemokines exist, classified into four families on the basis of differences in structure and function (CHARO; RANSOHOFF, 2006). One of the families of chemokines consists of CXC chemokines, which have a single amino acid residue interposed between the first two canonical cysteines. CXCR4, a seven transmembrane G-coupled receptor protein originally identified as a coreceptor for T cell line tropic strains of human immunodeficiency virus, is expressed in a wide variety of tissue and organ specific stem cells (KUCIA et al., 2005).

It is known that CXCR4 is overexpressed in cancer and plays a role in invasion and metastasis (BALKWILL, 2004). It has been suggested that chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 are involved in the migration, invasion and metastasis of breast cancer cells (MULLER et al., 2001; KANG et al., 2003; SMITH et al., 2004; LIANG et al., 2005; HOLLAND et al., 2006) and chemotherapeutic drugs have been proposed that may be effective in reducing CXCR4-mediated metastasis

(MEHTA et al., 2007). Kang et al. (2005) demonstrated, through the levels of CXCR4 transcript and protein in human breast cancer tissues, that the level of CXCR4 expression is significantly correlated with lymph node metastasis and suggested that CXCR4 may be a useful prognostic indicator and a potential therapeutic target in cancer therapies in patients presenting breast cancer.

Given the multifaceted role CXCR4 plays in diverse processes from development to cancer metastasis, CXCR4 is an intriguing therapeutic target. An ample body of work has been generated delineating potential pathways that mediate specific effects; however, a detailed basic understanding of receptor regulation is lacking. Understanding the precise mechanisms regulating CXCR4 function at the receptor level should provide insight into attractive therapeutic targets in this pathway. Furthermore, this will allow for translational research opportunities to dissect the specifics of how receptor regulation is altered in disease (BUSILLO; BENOVIC, 2007).

During the last years, the number of single markers that have been evaluated for disseminated tumour cells detection, mainly by nucleic acid-based techniques has considerably increased (LACROIX, 2006).

CXCR4 is a receptor of considerable biological significance and its numerous functions suggest that it is involved in diverse development processes. The aim of this study was to determine MDA plasma levels and to examine the relationship between these parameters, CXCR4 expression and breast cancer clinical stage.

MATERIAL AND METHODS

Following approval from the Human Ethics Committee of the State University of Londrina, peripheral blood was collected from breast cancer patients and normal healthy blood donors. A term of free informed consent was signed by all sample donors and patients involved prior to blood collection. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) (GREENE et al., 2002) classification criteria. The tumor-node-metastasis (TNM) system was initially developed by Pierre Denoix in 1942 and was a pioneering

attempt to classify cancer based on the major morphological attributes of malignant tumors that were thought to influence disease prognosis: size of the primary tumor (T), presence and extent of regional lymph node involvement (N), and presence of distant metastases (M). The International Union Against Cancer (UICC) presented a clinical classification of breast cancer based on the TNM system in 1958 (UICC, 1958) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) published a breast cancer staging system based on TNM in their first cancer staging manual in 1977 (BEAHRs et al., 1977). Since that time, regular revisions have been issued to reflect major advances in diagnosis and treatment. In the 1987 revision, differences between the AJCC and UICC versions of the TNM system were eliminated.

Peripheral blood was drawn in sterile syringe containing heparin, an anticoagulant, from 59 untreated breast cancer patients with a histopathological diagnosis of ductal carcinoma, according to World Health Organization (1983) classification system. Blood samples of breast cancer patients were provided by the Institute of Cancer in Londrina, Parana State, Brazil. Samples of 84 normal healthy blood donors were obtained from Blood Center of the University Hospital of Londrina, Parana State, Brazil.

Determination of MDA in plasma samples

Concerning the evaluation of the mean MDA values, the selected normal subjects and breast cancer patients were not affected by hypertension and were free from any pharmacological treatment. Plasma samples were kept frozen at -80°C to determine MDA levels by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (PILZ et al., 2000; MATEOS et al., 2005). A plasma sample (250 μL) was placed in a microtube and 50 μL of $\text{NaOH } 6.0 \text{ molL}^{-1}$ were added. Alkaline hydrolysis of protein bound MDA was achieved by incubating this mixture at 60°C in a water bath for 30 min. The protein product was precipitated with 125 μL of 35 % (v/v) perchloric acid, and the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant (250 μL) was transferred to a microtube and mixed with 25 μL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH; Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) prepared as a 5.0 mmolL^{-1} solution in 2.0 molL^{-1} hydrochloric acid. Finally, this reaction mixture was incubated for 30 min at

room temperature while protected from light. An aliquot of 50.0 μL of this reaction mixture was injected onto a HPLC system consisting of a Shimadzu LC-10AD pump (Kyoto, Japan), a Rheodyne 7725 valve (Cotati, California, USA) and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector (Milford, USA). Chromatography was carried out on a Microsorb - MV 100-5 C-18 (250 x 4.6 mm) (Varian Inc., Palo Alto, California, USA). The samples were isocratically eluted with a mobile phase of acetonitrile (50:50, v/v) containing 0.2 % (v/v) acetic acid in Milli-Q® ultrapure water (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA), at a flow rate of 0.6 mL/min at 30°C. Chromatograms were acquired at 310 nm (0.0025 AUFS) and processed by Empower software. Calibration curves were prepared diluting a standard solution of MDA (20.0 nmol/mL). For each day, a standard curve was prepared that was used for quantification. In all cases, the standards were treated exactly the same as the experimental samples.

MDA standard was prepared by dissolving 25 μL of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP; Sigma) in 100 mL water to achieve a 1.0 mmolL^{-1} stock solution. A working standard was prepared by hydrolysis of 1.0 mL TEP stock solution in 50.0 mL 1 % sulfuric acid and incubation for 2 h at room temperature. The resulting MDA standard of 20.0 nmol/mL was further diluted with 1% sulfuric acid to yield the final concentration of 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 nmol/mL to provide the standard curve used for quantification. The standard curve outlines a linear response for MDA concentrations and HPLC peak areas for total MDA ($r > 0.99$) in the range from 0.625 to 20.0 nmol/mL.

Nucleic acid preparation and reverse transcriptase reaction

Leukocytes were prepared from peripheral blood samples after using erythrocyte lysis buffer (0.32 M sucrose; 10mM Tris-HCl pH-7.5; 5mM MgCl_2 ; 1% Triton X-100). Total cellular RNA was extracted from peripheral white blood cells with Trizol (TRIzol LS; Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was resuspended in 18 μL of sterile water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, Invitrogen™). cDNA synthesis was realized using 500 ng and a GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer, Part Number N808-0017), with 0.4 μM of oligo dT primer using 20 units of cloned Moloney Murine Leukemia Virus

Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Invitrogen™) and 4 units of Recombinant Ribonuclease Inhibitor (RNaseOUT™; Invitrogen™) at 42°C for 60 min (50mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 mM of dNTP) in a Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler (Biosystems, Guelph, Ontario, Canada).

Molecular analysis of Beta-actin mRNA

PCR for beta-actin gene was performed as described by Amarante et al., (2005). cDNA synthesis was carried out using 7 µL of total RNA, extracted as previously described using the following PCR conditions for primers: 94°C for 1 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72° C for 1 min and finally, 72°C for 10 min in a Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler (Biosystems).

Quantitative real-time PCR for CXCR4 mRNA

One half microgram of total RNA was reverse transcribed (RT) as described above. Real-time PCR using SYBR green fluorescence was performed with 20 nanograms of cDNA in a total volume of 20 µl. Each real-time PCR reaction consisted of 2.5 µl RT product, 10 µl of Platinum®SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen™) and 0.25 µM of each sense and antisense primer. The amount of CXCR4 cDNA was estimated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) amplified using the sense primer 5' TGTTGGCTGAAAAGGTGGTC 3' and the antisense primer 5' AAAGATGAAGTCGGGAATAGTC 3', as an internal standard, human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified using the sense primer 5' GAAGGTGAAGGTCCGA 3' and the antisense primer 5' GGGTCATTGATGGCAACAA 3'. The PCR reaction was performed for 40 cycles and the condition of each cycle was as follows: 95°C for 30 sec, 54°C for 30 sec and 72°C for 30 sec using a Chromo4™ Real Time PCR Detection (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.).

The Ct values the cycle number at which emitted fluorescence exceeded an automatically determined threshold reported are the mean fold change + SEM for three independent determinations. Data from breast cancer and control groups show mean Δ Ct values, which are adjusted Ct values for CXCR4 that are corrected by Ct values for GAPDH from control samples, considering efficiency values, according to the Pfaffl method (PFAFFL, 2001). Subsequently, a melting curve was recorded between 50°C and 98°C with a hold every 2 s.

Statistical Analysis

Statistical analysis was realized by the Student t Test using the Scientific Graphing and Analysis Software OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA). A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

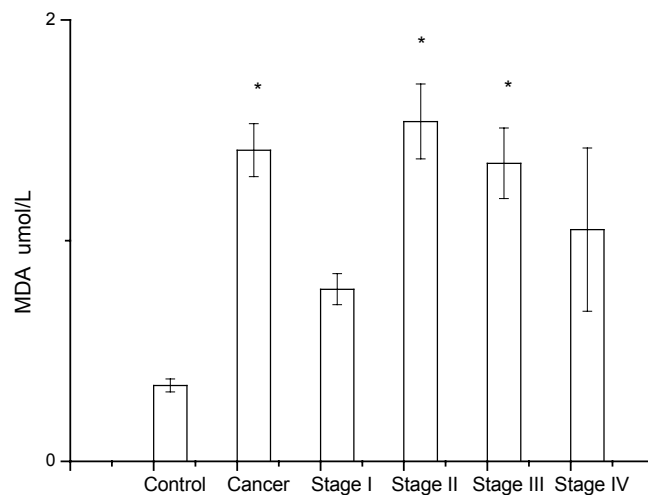
RESULTS

In the present investigation, 59 women patients presenting breast cancer, aged 31 to 76 years-old, diagnosed at the Cancer Institute of Londrina, Parana, Brazil, were studied. The majority of the patients presented ductal carcinoma. Diagnosis of the disease was based on clinical criteria, as determined by the Union of International Control of Cancer (UICC, 2002). The control group presented 84 women, aged 25 to 67 years-old, who were blood healthy donors presenting negative serology for HIV, HBV, HCV, HTLV, Chagas Disease and Syphilis from the University Hospital of the State University of Londrina, PR Brazil. Table 1 shows the distribution of the clinical stages, with the majority of patients classified as stage II and III.

Table 1 – Age of control subjects and breast cancer patients and clinical staging.

Age (years)	Control (84)	Breast Cancer (59)			
		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
25-40	48	1	3	4	-
41-50	22	-	7	8	1
51-60	13	1	15	5	-
>60	1	-	4	8	2
		(2)	(29)	(25)	(3)

The present study was conducted to evaluate the MDA concentration in breast cancer patients in relation to different clinical stages. MDA levels obtained for total breast cancer patients (1.41 ± 0.11) were significantly higher than those obtained for healthy subjects ($0.34 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$) and regarding staging, MDA plasma concentrations were higher for stage II and III (1.35 ± 0.16 and $1.54 \pm 0.17 \mu\text{mol/L}$, respectively) than for control group ($p < 0.0001$), although MDA plasma concentration values were higher in all clinical stages, as demonstrated in the Figure 1.

**Figure 1** – Mean plasma concentrations of malondialdehyde (MDA) in patients and controls.

For the CXCR4 mRNA assays, the viability of the RNA samples and quality of cDNA was analyzed by amplification of beta-actin. Conventional PCR was

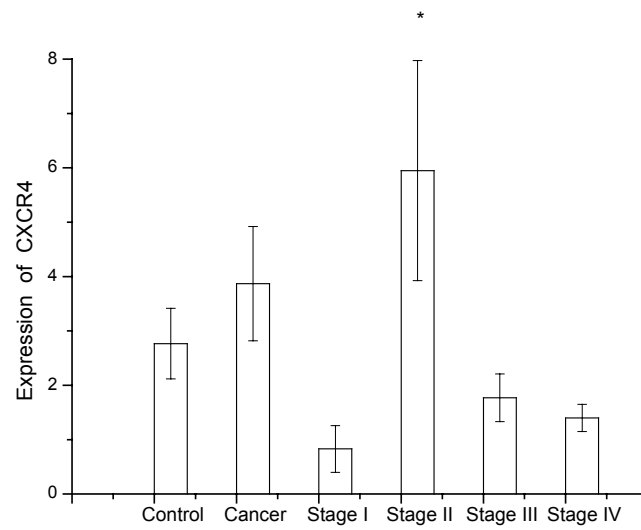
performed with specific primers. All the RNA samples presented detectable quantities of beta-actin mRNA and acceptable integrity during amplification. When contaminants of genomic DNA occur, the amplification product obtained is 573bp. No 573bp band was verified in the gel, indicating no contamination with genomic DNA. Amplicons of 353bp for β -actin were detected (Fig. 2).



Figure 2 – Expression of mRNA for beta-actin from human peripheral blood cells. Integrity of RNA samples was analyzed. RT-PCR of β -actin mRNA of peripheral blood cells was verified. All samples demonstrated only 353 bp product indicating RNA viability and no contamination with genomic DNA. L: Ladder (Invitrogen™, Carlsbad, USA), B: Blank and S: Sample.

In the next step, the expression of mRNA for CXCR4 was investigated. In human peripheral blood cells, real-time PCR analysis showed that no statistical significance was obtained for CXCR4 expression between breast cancer patients (3.87 ± 1.05) and the normal healthy control group (2.76 ± 0.65). However, the stage II samples (5.95 ± 2.05) presented higher expression than controls and the other stages, with statistically significant differences (Figure 3).

(a)



(b)

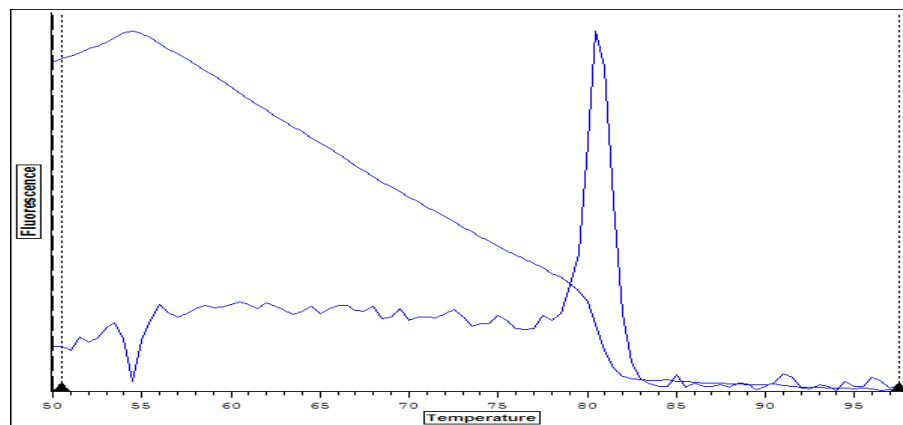


Figure 3 – (a) CXCR4 expression in healthy donors and breast cancer patients. (b) Profile of melting curve for CXCR4 revealing the specific product peak at 80.5°C.

DISCUSSION

Oxidative stress is considered to be involved in the pathophysiology of all cancers. The aim of this study was to examine oxidative stress in patients

presenting breast cancer by evaluation of the plasma levels of lipid peroxidation products, such as MDA.

MDA is most frequently determined by spectrophotometry, using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). This is a simple and inexpensive method, yet highly inaccurate, since TBA reacts not only with MDA, but also with many other compounds (e.g. carbohydrates, pigments, amino acids, pyridines, etc.) (JANERO, 1990; YEO et al., 1994), leading to considerable variability in the results. On the other hand, its chromatographic approach measures the 2TBA-MDA adduct after separation by reversed-phase HPLC with fluorescence (SUTTNAR et al., 1997; VOLPI et al., 1998) or UV-vis detection at 532 nm (SUTTNAR et al., 2001). However, the reaction of MDA with TBA still requires treatment at high temperatures (95-100°C) for extended incubation times (up to 150 min) (SAKAI et al., 1999; CHIRICO et al. 1994; FUKUNAGA et al. 1995; VOLPI et al. 1998) in strong acidic conditions (pH 1.5-3.5), which may result in artifactual peroxidation of sample constituents even in the presence of added antioxidants (i.e. BHT) (MATEOS et al. 2005). Alternatively, derivatization of MDA with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and conversion into pyrazole and hydrazone derivatives has been found to permit specific estimation of this compound, especially when obtaining separation using HPLC (EKSTROM et al., 1988; CORDIS et al., 1993).

Determining MDA values is an important contribution to the assessment of oxidative stress. A sensitive and reproducible high-performance isocratic liquid chromatography (HPLC) method for determining of plasma MDA in the assessment of lipid peroxidation is reported here. In the present study, MDA concentrations in total breast MDA levels were significantly higher than those in healthy subjects.

Several reports exist that reveal increases in MDA concentration in patients presenting neoplasm (THANGARAJU et al., 1994; RAY et al., 2000; SENER et al., 2007). It has also been reported that lipid peroxidation in breast cancer tissues was enhanced compared to nonmalignant tissues (TAS et al., 2005).

Nitric oxide (NO) and MDA play a significant role in DNA damage, sister-chromatid exchanges and carcinogenesis. Patients with stage II disease showed the highest levels of both NO and MDA, compared with controls (RAY et al., 2001). However, in the present work, observation showed that MDA concentrations were higher in clinical stage II ($1.54 \mu\text{mol/L} \pm 0.17$) and stage III ($1.35 \mu\text{mol/L} \pm 0.16$);

stage I and stage IV results were not considered because the number of samples was low. In agreement with the present results, Ray et al. (2000) also verified that MDA concentration was significantly increased in stage II and stage III, compared to their corresponding controls.

Numerous studies provide evidence confirming that menopausal status is strongly related to the risk of breast cancer, but menopausal status had no significant effect on plasma MDA in either breast cancer patients or controls in a study by Gonenç et al. (2001).

Signals from the microenvironment have a profound influence on the maintenance and/or progression of hematopoietic and epithelial cancers. CXCR4 antagonists, although initially developed for the treatment of AIDS, could become effective agents for the treatment of neoplastic disease (BURGER; KIPPS, 2006).

Although it is commonly accepted that the clinical behavior of tumors depends on the relationship between tumor cells and the host, numerous studies involving molecular research have identified tumor-derived markers, whereas little is known about the predictive potential of host factors and their potential role in the breast cancer pathogenesis. CD4 T cells express CXCR4, a member of the CXC chemokine receptor family, which possesses SDF1/CXCL12 as an exclusive ligand. Chemokine receptors have been implicated in the pathogenesis of many diseases. One of the most studied chemokine receptors is CXCR4, primarily due to its role as a coreceptor for HIV entry (FENG et al., 1996) and its ability to mediate the metastasis of a variety of cancers (ZLOTNIK, 2006).

The development of distant metastases is the major cause of death from most cancers. In order to predict and prevent tumour spreading, many attempts are being made to detect small numbers of tumour cells that have shed from the primary lesions and have moved to lymph nodes, blood or bone marrow. The significance of disseminated tumor cells (DTC) for prognosis and prediction of response to therapy could be examined on breast cancer (LACROIX, 2008).

In the present study, analysis of the results showed that CXCR4 expression in the peripheral blood samples was not statistically significant in breast cancer patients compared to the normal healthy control group. However, stage II samples revealed higher CXCR4 expression than controls and samples from other stages, such that this was statistically significant. In this work, 86.2% and 84.0% of

patients with stage II and III respectively, presented dissemination to the lymph nodes.

Zhang et al (2006) studied the expression of plasma SDF-1 and its receptor CXCR4 in peripheral blood mononuclear cells of children and proposed that CXCR4 mRNA might be involved in the development of coronary artery lesions in Kawasaki disease; moreover, Egan et al (2008) observed a generalized reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes.

As an intracellular second messenger, nitric oxide (NO) is increasingly implicated in the control of transcriptional machinery and gene expression. It has been shown that cell surface expression of CXCR4 on CD34(+) cells was increased in a dose- and time-dependent manner in response to NO donors. In this context, Zhang et al., (2007) demonstrated that the NO pathway can modulate CXCR4 expression in human CD34(+) cells and suggests that NO may play a critical role in the trafficking of hematopoietic progenitors (ZHANG et al., 2007).

The present results suggest that the increase in malondialdehyde in the plasma of patients could be involved in the enhancement of CXCR4 expression on circulating leukocyte populations of the immune process during stage II or indicate disseminated tumour cells on peripheral blood. Taken together, plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression could play a role in the pathogenic mechanisms in breast cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible and Cancer Institute of Londrina, PR, Brazil for their collaboration. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Londrina State University Coordination for Postgraduation (PROPPG-UEL). Master post graduate student, Juliana Laino do Val Carneiro was a fellow of CAPES. The authors would like to express their gratitude to GENOPAR for

supplying laboratory equipment and Finep for supplying Chromo4™ Real Time PCR Detection.

The entire article was revised by Philip S. P. Badiz, a British-born scientific text editor.

REFERENCES

- SENER, D.E.; GÖNENÇ, A.; AKINCI, M.; TORUN, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. **Cell Biochem. Funct.**, 25(4):377-82, 2007.
- GÖNENÇ, A.; OZKAN, Y.; TORUN, M. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. **J. Clin. Pharm. Ther.**, 26(2):141-4, 2001.
- GAWĘ, S.; WARDAS, M.; NIEDWOROK, E. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiad Lek.** 57(9-10):453-5, 2004.
- DEL RIO, D.; STEWART, J.A. A review of recent studies on MDA as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 15(4):316-28, 2005.
- POLIDORI, M.C.; SAVINO, K.; ALUNNI, G.; FREDDIO M.; SENIN, U.; SIES, H.; STAHL, W.; P MECOCCHI, P. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. **Free Radic. Biol. Med.**, 32(2):148-52, 2002.
- CARUZ, A.; SAMSOM, M.; ALONSO, J.M.; ALCAMI, J.; BALEUX, F.; VIRELIZIER, J.L.; PARMENTIER, M.; ARENZANA-SEISDEDOS, F. Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. **FEBS Lett.**, 426:271-278, 1998.
- SACCANI, A.; SACCANI, S.; ORLANDO, S.; SIRONI, M.; BERNASCONI, S.; GHEZZI, P.; A. MANTOVANI, AND SICA, A. Redox regulation of chemokine receptor expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97:2761-2766, 2000.
- HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; FISHER, I.; SOZZANI, S.; PEIPER, S.C.; HORUK, R.; ALI, H.; SNYDERMAN, R. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. **J. Biol. Chem.**, 272:28726-28731, 1997.
- CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N. Engl. J. Med.**, 354:610-621, 2006.

KUCIA, M.; RECA, R.; MIEKUS, K.; WANZECK, J.; WOJAKOWSKI, W.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M.Z. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. **Stem Cells**, 23:879-894, 2005.

BALKWILL, F. The significance of cancer cell expression on the chemokine receptor CXCR4. **Semin. Cancer Biol.**, 14:171-179, 2004.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M.E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S.N.; BARRERA, J.L.; MOHAR, A.; VERÁSTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410:50-56, 2001.

KANG, Y.; SIEGEL, P.M.; SHU, W.; DROBNJAK, M.; KAKONEN, S.M.; CORDON-CARDO, C.; GUISE, T.A.; MASSAGUÉ, J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. **Cancer Cell**, 3:537-549, 2003.

SMITH, M.C.; LUKER, K.E.; GARBOW, J.R.; PRIOR, J.L.; JACKSON, E.; PIWNICAWORMS, D.; LUKER, G.D. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. **Cancer Res.**, 64:8604-8612, 2004.

LIANG, Z.; YOON, Y.; VOTAW, J.; GOODMAN, M.M.; WILLIAMS, L.; SHIM, H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. **Cancer Res.**, 65: 967-971, 2005.

HOLLAND, J.D.; KOCHETKOVA, M.; AKEKAWATCHAI, C.; DOTTORE, M.; LOPEZ, A.; MCCOLL, S.R. Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. **Cancer Res.**, 66(8):4117-24, 2006.

MEHTA, S.A.; CHRISTOPHERSON, K.W.; BHAT-NAKSHATRI, P.; GOULET, JR R.J.; BROXMEYER, H.E.; KOPELOVICH, L.; NAKSHATRI, H. Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. **Oncogene** 26:3329-37, 2007.

KANG, H.; WATKINS, G.; DOUGLAS-JONES, A.; MANSEL, R.E.; JIANG, W.G. The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer. **Breast**, 14(5):360-7, 2005.

BUSILLO, J.M.; BENOVIC, J.L. Regulation of CXCR4 Signaling. **Biochim. Biophys. Acta**, 1768(4):952-963, 2007.

LACROIX, M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. **Endocrine-Related Cancer**, 13: 1033–1067, 2006.

GREENE, F.L.; PAGE D.L.; FLEMING, I.D., et al. **AJCC Cancer Staging Manual**. 6th ed. New York: Springer; 2002.

UICC Committee on Clinical Stage Classification and Applied Statistics. **Clinical Stage Classification and Presentation of Results, Malignant Tumors of the Breast and Larynx**. Paris: International Union Against Cancer; 1958.

BEAHR, O.H.; CARR, D.T.; RUBIN, P. **Manual for Staging of Cancer**. Philadelphia: Lippincott, 1977.

The World Health Organization. Histological typing of breast tumors. *Neoplasma*, 30(1):113-23, 1983.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **J. Chromatog. B.**, 742:315–325, 2000.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **J. Chromatog. B.**, 827:76-82, 2005.

AMARANTE, M.K.; DE LUCCA, F.L.; OLIVEIRA, C.E.C.; FUNGARO, M.H.P.; REICHE, E.M.V.; MUXEL, S.M.; WATANABE, M.A.E. Expression of noncoding mRNA in human blood cells activated with synthetic peptide of HIV. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 35:286-90, 2005.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, 29(9):45, 2001

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic. Biol. Med.**, 9(6):515-40, 1990.

YEO, H.C.; HELBOCK, H.J.; CHYU, D.W.; AMES, B.N. Assay of Malondialdehyde in Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Anal. Biochem.**, 220(2):391-396, 1994.

SUTTANAR, J.; CERMAK, J.; DYR, E. Solid-Phase Extraction in Malondialdehyde Analysis. **Anal. Biochem.**, 249(1): 20-23, 1997.

VOLPI, N.; TARUGI, P. Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. **J. Chromatogr. B.**, 713(2):433-437, 1998.

SUTTANAR, J.; MASOVA, L.; DYR, E. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, 751(1):193-119, 2001.

SAKAI, T.; HABIRO, A.; KAWAHARA, S. High-performance liquid chromatographic determination of 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct in fish meat **J. Chromatogr. B.** 726(1-2):313-316, 1999.

CHIRICO, S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. **Methods Enzymol.**, 233:314-8, 1994.

FUKUNAGA, K.; TAKAMA, K.; SUZUKI, T. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Plasma Malondialdehyde Level without a Solvent Extraction Procedure. **Anal. Biochem.**, 230(1):20-23, 1995.

EKSTROM T, GARBERG P, EGESTAD B, HOGERG J. Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography. **Chem. Biol. Interact.** 66(3-4):177-187, 1988.

CORDIS, G.A.; MAULIK, N.; BAGCHI, D.; ENGELMAN, R.M.; DAS, D.K. Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr.** 632(1-2):97-103, 1993.

THANGARAJU, M.; VIJAYAKALAKSHMI, T.; SACHDANANDAM, P. Effect of tamoxifen on lipid peroxide and antioxidative system in postmenopausal women with breast cancer. **Cancer**, 74:73-82, 1994.

RAY, G.; BATRA, S.; SHUKLA, N.K. Lipid peroxidation, free radical. and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, 59:163-170, 2000.

TAS, F.; HANSEL, H.; BELCE, A.; ILVAN, S.; ARGON, A.; CAMLICA, H.; TOPUZ, E. Oxidative stress in breast cancer. **Med. Oncol.**, 22(1):11-15, 2005.

RAY, G.N.; SHAHID, M.; HUSAIN, S.A. Effect of nitric oxide and malondialdehyde on sister-chromatid exchanges in breast cancer. **Br. J. Biomed. Sci.**, 58(3):169-76, 2001.

FENG, Y.; BRODER, C.C.; KENNEDY, P.E.; BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, 272(5263):872-7, 1996.

ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. **Contrib. Microbiol.**, 13:191-9, 2006.

BURGER, J.A.; KIPPS, T.J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, 107(5):1761-67, 2006.

LACROIX, M. **Disseminated tumor cells: detection, markers and prognostic/predictive significance.** In Cancer Metastases Research, Nova Sciences Publishers, New York, 1-45, 2008.

ZHANG, J.; GUI, Y.H.; YANG, Y. Expression of plasma SDF-1 and its receptor CXCR4 in peripheral blood mononuclear cells of children with Kawasaki disease. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, 8(4):283-6, 2006.

EGAN, C.G.; LAVERY, R.; CAPORALI, F.; FONDELLI, C.; LAGHI-PASINI, F.; DOTTA, F.; SORRENTINO, V. Generalised reduction of putative endothelial progetitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. **Diabetologia**, 51(7):1296-305, 2008.

ZHANG, Y.; WITTNER, M.; BOUAMAR, H.; JARRIER, P.; VAINCHENKER, W.; LOUACHE, F. Identification of CXCR4 as a new nitric oxide-regulated gene in human CD34+ cells. **Stem Cells**, 25(1):211-9, 2007.

WANG, G.; KÖNIG, R.; ANSARI, G.A.; KHAN, M.F. Lipid peroxidation-derived aldehyde-protein adducts contribute to trichloroethene-mediated autoimmunity via activation of CD4+ T cells. **Free Radic. Biol. Med.**, 44(7):1475-82, 2008.