

Expressão de PGC-1 em subtipos moleculares do câncer de mama

PGC-1 expression in breast cancer subtypes

Vanessa Jacob Victorino¹, Wermerson Assunção Barroso¹, Vivian Cury¹, Isabela Casagrande Jeremias¹, Suely Kubo Ariga¹, Carolina Panis², Thais Martins Lima¹, Heraldo Possolo de Souza¹

¹Laboratório de Investigação Médica – LIM 51, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brasil.

²Laboratório de Mediadores Inflamatórios, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Endereço para correspondência:

Vanessa Jacob Victorino

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

São Paulo – Brasil

Telefone: (11) 3061 7000

E-mail: vanjacob@gmail.com

Resumo

Apesar dos avanços no tratamento dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama, diversos efeitos colaterais e resistência ao tratamento são observados. Nesse contexto, a busca por novos marcadores moleculares ainda é necessária. Trabalhos em nosso laboratório mostram que o coativador - 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama-1 (PGC-1)- β influencia a proliferação celular de câncer de mama HER2-positivo por modular vias metabólicas e de sinalização redox. Contudo, a expressão de membros da família PGC-1 nos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama e seu efeito sobre esses marcadores ainda permanecem desconhecidos. Este trabalho tem como objetivo determinar a expressão de PGC-1 α/β em linhagens tumorais de mama luminal (MCF-7), HER2-positiva (SKBR-3) e triplo-negativa (MDA-MB-231) em relação a uma linhagem de mama não tumoral (MCF-10A) e avaliar sua influência sobre esses marcadores. Para atingir os objetivos, primeiramente foi avaliada a expressão de PGC-1 α e β em células tumorais de mama MCF-7, SKBR3 e MDAMB231 comparada com MCF-10A por RT-PCR. Os resultados mostraram maior expressão gênica apenas de PGC-1 β na superexpressão de HER2. Em seguida, sequências específicas de RNA de interferência (RNAi) foram utilizadas para o *knockdown* de PGC-1 β nas células SKBR3 a fim de avaliar sua influência sobre o marcador HER2 e se o *knockdown* de PGC-1 β causaria uma compensação via PGC-1 α , utilizando a técnica de RT-PCR. O tratamento com RNAi para PGC-1 β não interferiu na expressão de HER2 e não induziu compensação por PGC-1 α . Concluímos que o *knockdown* de PGC-1 β nas células SKBR3 não influencia na expressão de HER2 e espera-se que os resultados desse estudo contribuam para pesquisas futuras que visem o tratamento com RNAi em combinação com terapias alvo-HER2, as quais poderão se tornar potentes alvos terapêuticos no futuro.

Palavras-chave: Câncer de mama, subtipos moleculares, PGC-1

Abstract

Despite a marked improvement in treatments for all breast cancer subtypes, several side-effects and resistance to therapy are noticed. In this context, the searching for new molecular targets is still necessary. Studies in our laboratory has shown that the peroxisome proliferator-activated receptor- gamma coactivator 1 (PGC-1) - β influence cell proliferation of HER2-positive breast cancer by modulating metabolic and redox signaling pathways. However, the expression of members from PGC-1 family in distinct molecular subtypes of breast cancer and its effect on these markers remain unknown. This study aims to determine the expression of PGC-1 α/β in breast cancer cell lines as luminal (MCF-7), HER2-overexpressed (SKBR3) and triple- negative (MDAMB231) as compared to a non-tumoral breast cell line (MCF-10A) and assess its influence on these markers. To achieve these goals, PGC-1 α and β expression were evaluated in MCF-7, SKBR3 and MDAMB231 breast tumor cells compared to MCF-10A by RT-PCR. Our results show higher gene expression only for PGC-1 β in the HER2-overexpression. Next, specific sequence of small interfering RNA (siRNA) was used for PGC-1 β knockdown on SKBR3 cells and assessed its influence on the HER2 marker and whether the PGC-1 β knockdown cause compensation PGC-1 α via, using the technique of RT-PCR. The PGC-1 β -siRNA treatment did not interfere with HER2-overexpression and did not induce compensation of PGC-1 α . We conclude that PGC-1 β knockdown in SKBR3 cells does not influence HER2-overexpression and we hope that the results of this study may contribute to future research aimed the treatment with siRNA in combination with HER2-target therapies, which may become potent therapeutic targets in the future.

Keywords: Breast cancer, molecular subtypes, PGC-1

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia feminina mais incidente em todo o mundo ⁽¹⁾. Clinicamente os tumores de mama podem ser agrupados em subtipos moleculares de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), e presença ou ausência do receptor epitelial humano 2 (HER2) e quanto a expressão do marcador de proliferação tumoral Ki-67 ⁽²⁾. Os guias atuais definem 4 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2- positivo e triplo-negativo ⁽³⁾. O subgrupo luminal A é caracterizado por expressão positiva dos receptores hormonais, sem superexpressão de HER2, juntamente com baixa expressão do marcador Ki-67. O subgrupo luminal B pode ser ainda subdividido em luminal B com expressão negativa de HER2 ou luminal B com expressão positiva de HER2. Em ambos os subgrupos há expressão positiva para RE. O subgrupo HER2 apresenta positividade para a amplificação de HER2 e negatividade para RE e RP. Por fim, o subtipo molecular triplo negativo é definido por ausência de RE, RP e HER2 ⁽⁴⁾.

Classificar os subtipos moleculares no câncer de mama é de grande importância visto que subgrupos distintos devem receber diferentes tratamentos clínicos. Nos últimos anos foram observados avanços significativos no tratamento dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama. Contudo, diversos efeitos colaterais e resistência ao tratamento quimioterápico ainda são observados ⁽⁵⁻¹¹⁾. Nesse contexto, a busca ativa por novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos ainda se faz extremamente necessária.

O coativador - 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama-1 (PGC-1) foi primeiramente descrito por Puigserver e colaboradores em 1998 como um coativador induzido em gordura marrom por exposição ao frio, possuindo importante papel como regulador de diversos genes que controlam a termogênese adaptativa ⁽¹²⁾. Sabe-se que as variações dos níveis de expressão de membros da família PGC-1 em

células cancerígenas podem configurar um efeito pró-sobrevivência e que alterações na expressão de membros da família PGC-1 vem sendo avaliadas por diversos autores em diferentes modelos de câncer. Entretanto, os resultados diferem de acordo com o tipo de câncer e ainda são controversos. Recentemente mostramos que o *knockdown* da expressão de PGC-1 β diminui a proliferação de células tumorais de mama HER2-positivas modulando vias metabólicas e de sinalização redox⁽¹³⁾. Contudo, a expressão de PGC-1 em suas isoformas α e β nos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama e sua influencia sobre esses marcadores ainda não foi avaliado. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a expressão de PGC-1 α/β em linhagens tumorais de mama luminal, HER2-positiva e triplo-negativa em relação a uma linhagem de mama não tumoral e avaliar sua influencia sobre esses marcadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo celular

Foi utilizada a linhagem tumoral de mama SKBR3 como equivalente ao subtipo molecular HER2-positivo, MDA-MB-231 equivalente ao subtipo molecular triplo-negativo, e MCF-7 como luminal. Como linhagem não tumoral, foi utilizada a célula imortalizada derivada de tecido mamário benigno MCF-10A. As células MCF10A foram mantidas em meio MEGM (Lonza) contendo 100ng/ mL de toxina de cólera. As células SKBR3 foram mantidas em meio McCoy, pH 7,2 e 10% de soro fetal bovino (Gibco). As células MCF-7 foram mantidas em meio RPMI 1640 (Cultilab), pH 7,2 e 10% de soro fetal bovino (Gibco). As culturas foram mantidas em atmosfera contendo 95% O₂ e 5% CO₂ a 37°C. As células da linhagem MDA-MB-231 foram mantidas em meio Leibovitz L-15, pH 7,2, 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100% O₂, 37°C, segundo guia da ATCC (*American Type Culture Collection*)⁽¹³⁾.

Silenciamento de PGC-1 β por RNA de interferência (RNAi)

As células tumorais de mama HER2- positivas foram plaqueadas em placas de 6 poços a 2,5x10⁵ células/poço. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Foram realizados 6 grupos de acordo com a tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Grupos experimentais.

Grupo	Reagentes
Controle	Opti-MEM I
Lipofectamina	Opti-MEM I e lipofectamina
Negativo 1	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência negativa 1
Negativo 2	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência negativa 2
Sequência 1	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência 1 específica para PGC-1 β
Sequência 2	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência 2 específica para PGC-1 β

Foi adicionado 1 nM de concentração final de RNAi e 5 μ l de Lipofectamina RNAi MAX (Invitrogen) para cada grupo. Essa solução reagiu por 20 minutos para a formação dos complexos em temperatura ambiente. Foi adicionado meio de transfecção Opti-MEM I (Invitrogen) para totalizar o volume final de 2,5 mL/poço. As sequências negativas de RNAi foram desenhadas pela Ambion *by life Technologies* e não interferem na expressão gênica. As sequências específicas de RNAi para PGC-1 β foram desenhadas pela Ambion *by life Technologies*, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Sequências de RNA de interferência (RNAi) utilizadas.

<i>RNAi</i>	<i>Sequências</i>	
Sequência 1	<i>Sense</i>	GAG CCG AAG UUG UAC AGA Att
	<i>Antisense</i>	UUC UGU ACA ACU UCG GCU Ctg
Sequência 2	<i>Sense</i>	CAG AUA CAC UGA CUA CGA Utt
	<i>Antisense</i>	AUC GUA GUC AGU GUA UCU Ggg

As células em cultura foram avaliadas 72 horas após a transfecção com RNAi e foram recolhidas para posterior mensuração da expressão de PGC-1s e testes ⁽¹³⁾.

Extração de RNA e PCR

A extração do RNA total seguiu conforme protocolo do fabricante após adição de 1 ml de TRIzol (Invitrogen) em cada poço de cultura celular. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando biofotômetro (NanoVue, GE Healthcare) em comprimento de onda de 260nm. Os níveis de transcritos foram determinados por Real-Time (RT)- PCR (Applied Biosystems) com primers específicos (Invitrogen), e o resultado foi calculado sob a razão da expressão do gene *housekeeping* B2M utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, também determinado por RT- PCR.

A reação de RT-PCR foi realizada com 15 μ l de volume total, sendo 1,6 μ l de água deionizada estéril, 7,5 μ l SYBR Green qPCRsuperMix-UDG (Invitrogen), 0,3 μ l de cada primer (sense e antisense) a 10 pmol/ml, 0,3 μ l de ROX e 5 μ l de RNA a 100 ng diluído em água DEPC. A reação foi realizada em aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). A transcrição reversa foi realizada a 50 °C por 15 minutos e 95 °C por 5 minutos. A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos, e 72 °C por 30 segundos por 35 ciclos. A curva de *melting* foi realizada a 95 °C por 15 segundos, 65 °C por 1 minuto, e 95 °C por 15 segundos ⁽¹³⁾.

Tabela 3. Sequências utilizadas para realização de RT-PCRs.

<i>Gene</i>	<i>Sequências</i>	
B2M	<i>Sense</i>	GAT GAG TAT GCC TGC CGT TGC
	<i>Antisense</i>	CAA TCC AAA TGC GGC ATC T
PGC1α	<i>Sense</i>	CAC CAG CCA ACA CTC AGC TA
	<i>Antisense</i>	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT
PGC1β	<i>Sense</i>	TGT TCA GAC AGA ACG CCA AG
	<i>Antisense</i>	ACA CCG GTA GGT GAT GAA GC
HER2	<i>Sense</i>	AGT TAC CAG TGC CAA TAT CC
	<i>Antisense</i>	CAA AGC TCT CCG GCA GAA

Análise Estatística

As análises foram realizadas com N=6. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Foi utilizado o teste *t* de Student ou a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. Foi considerado como significativa diferença com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Inicialmente nós investigamos a expressão de PGC-1 α e β , em células tumorais de mama MCF7 (luminal), SKBR3 (HER2) e MDAMB231 (triplo negativa) em relação a uma linhagem de mama não tumoral (MCF10A). Nossos resultados mostram menor expressão de PGC-1 α nas linhagens tumorais MCF7 e SKBR3 quando comparada com a linhagem não tumoral ($p < 0,05$) e não houve alteração significativa para MDAMB231 (Figura 1, painel a).

A expressão de RNAm para PGC-1 β foi 4x mais elevada na linhagem celular HER2-positiva do que na célula de mama não tumoral ($p < 0,001$), enquanto que a expressão de PGC-1 β nas linhagens luminal e triplo negativa foi significativamente menor (Figura 1, painel b; $p < 0,001$).

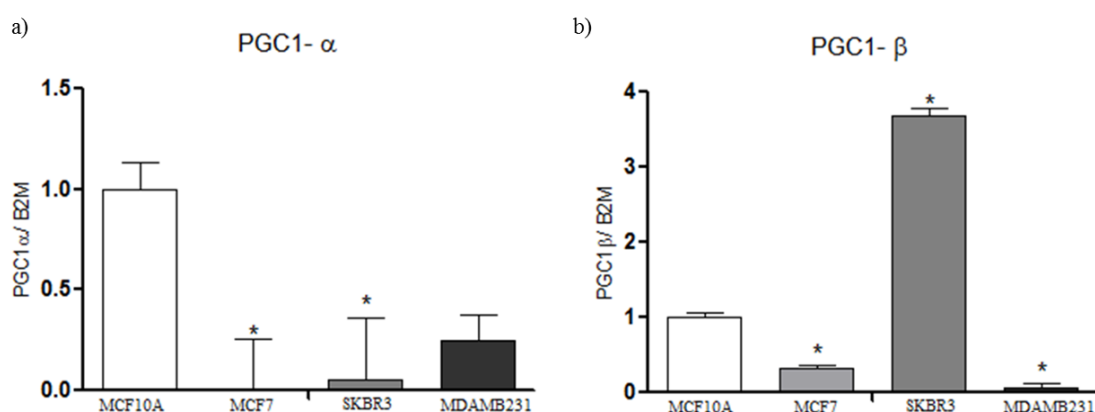


Figura 1. Expressão de a) PGC-1 α e b) PGC-1 β em células não tumorais de mama imortalizadas espontaneamente (MCF10-A), e células tumorais de mama luminais (MCF7), HER2- positivas (SKBR3) e triplo negativas (MDAMB231). Os resultados estão expressos como média \pm erro das médias. * $p < 0,05$ indica diferença estatística entre a linhagem não tumoral (MCF10-A) e as linhagens tumorais (MCF7, SKBR3 e MDAMB231) utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA seguido de Tukey como pós- teste.

Visto que apenas a linhagem SKBR3 apresentou maiores níveis de RNAm para PGC-1 β , nosso próximo passo foi investigar se a expressão de PGC-1 β pode interferir na expressão de HER2. Para atingir esse objetivo, realizamos experimentos utilizando sequências específicas de RNAi com a finalidade de diminuir a expressão de PGC-1 β nessas células. Como controle interno, foram realizados grupos utilizando apenas o meio de cultura de transfecção (grupo controle) e outro utilizando o meio de cultura de transfecção e lipofectamina (grupo lipofectamina). Os reagentes utilizados para os testes de transfecção não influenciam a expressão de PGC-1 β (Figura 2, painel a; $p > 0,05$). Como controle negativo, utilizamos duas sequências negativas de RNAi, as quais entram na célula, mas não interferem na expressão gênica. Nossos resultados confirmam que as sequências negativas 1 e 2 não interferem na expressão de PGC-1 β quando comparado ao grupo lipofectamina (Figura 2, painel b; $p > 0,05$). Em seguida, utilizamos duas sequências desenhadas especificamente para interferir na expressão de PGC-1 β . A sequência 1 específica para PGC-1 β diminuiu significativamente em 50% de sua

expressão gênica comparando com os controles negativos ($p < 0,01$), enquanto que a sequência 2 específica para PGC-1 β diminuiu em aproximadamente 20% de sua expressão quando comparada às sequências negativas 1 e 2 e não teve diferença significativa (Figura 2, painel c; $p > 0,05$).

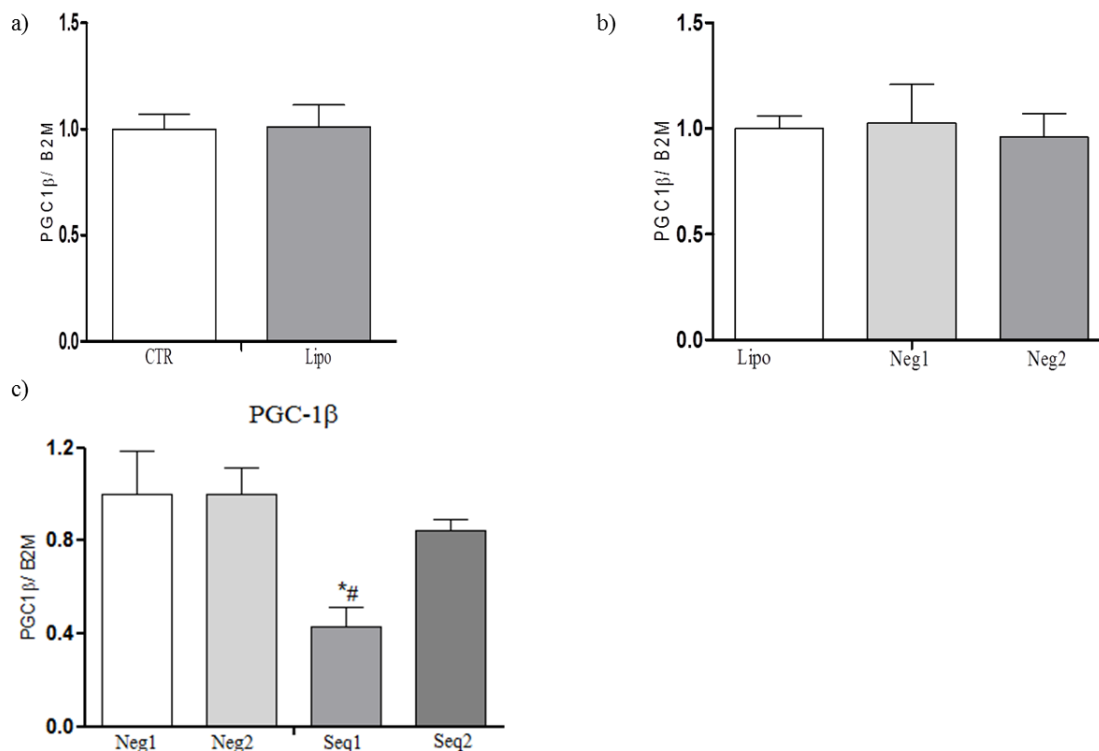


Figura 2. *Knockdown* da expressão de PGC-1 β em células HER2- positivas (SKBR3) utilizando RNA de interferência. a) Controle interno de *knockdown* da expressão de PGC-1 β em células HER2- positivas após 72 horas de tratamento com OPT-MEM (controle- CTR) e lipofectamina (lipo). b) Controle interno da expressão gênica de PGC-1 β nos grupos Lipo comparando com os controles negativo 1 (Neg1) e negativo 2 (Neg2). c) Diminuição da expressão de PGC-1 β para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). * $p < 0,05$ indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # $p < 0,05$ indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste t de Student ou One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Em seguida, analisamos se o *knockdown* de PGC-1 β influencia a superexpressão do marcador HER2. Nossos resultados revelam que a expressão de PGC-1 β não interfere na expressão de HER2 (Figura 3, painel a; $p > 0,05$). Por fim, investigamos se o *knockdown* de PGC-1 β causaria uma compensação de PGC-1 em sua isoforma α . Como mostrado na Figura 3, painel b, o *knockdown* de PGC-1 β não influenciou a expressão de PGC-1 α ($p > 0,05$).

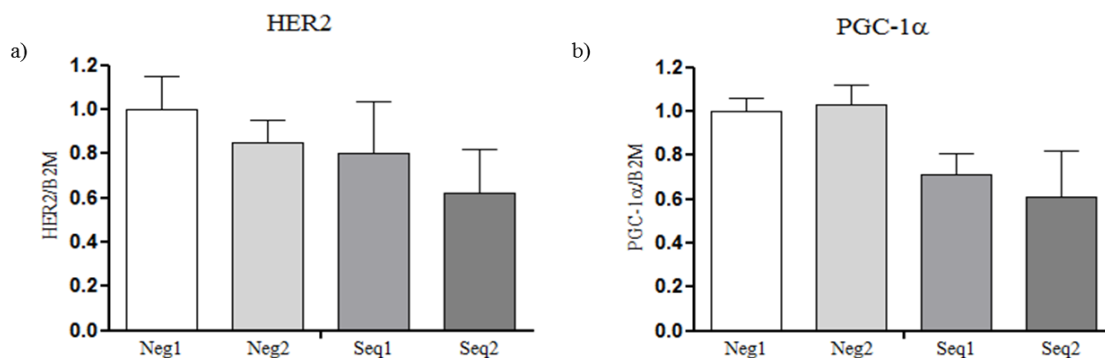


Figura 3. *Knockdown* da expressão de PGC-1 β em células HER2- positivas (SKBR3) não influencia a expressão de a) HER2 e b) PGC-1 α . Os resultados estão expressos como média \pm erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. Legenda: sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2), sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2).

DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos que ocorre uma baixa expressão gênica de PGC-1 α nos subtipos moleculares das linhagens celulares de câncer de mama em comparação a uma linhagem de mama não tumoral. Em relação à expressão gênica de PGC-1 β , essa se apresenta elevada somente em células onde há também superexpressão de HER2. Em mulheres portadoras do câncer de mama, mostramos também que há maior expressão gênica de PGC-1 β em tumores HER2 positivos quando comparados com os subtipos luminal A, luminal B e triplo-negativo⁽¹³⁾.

As linhagens tumorais de mama são agrupadas dentro de diferentes classes moleculares por apresentarem um padrão distinto de marcadores, que são utilizados como alvos terapêuticos. As linhagens MCF-7, SKBR-3 e MDAMB-231 diferem entre si e da linhagem não tumoral MCF-10A não apenas em relação a seus marcadores moleculares, mas também na expressão de diversas proteínas. A grande maioria das alterações protéicas entre as linhagens tumorais de mama está relacionada a processos metabólicos⁽¹⁴⁾. As diferentes proteínas expressas nas linhagens celulares tumorais de mama podem ser decorrentes da diferença na ativação de cofatores e fatores de transcrição, tais como de PGC-1s.

O padrão de expressão de PGC-1s em determinados subtipos moleculares do câncer de mama ainda não é estabelecido. Entretanto, sabe-se que há uma relação entre a expressão de PGC-1 β e o subtipo molecular HER2. Em trabalhos publicados em nosso laboratório, mostramos um importante papel para a sinalização por HER2/PGC-1 β /ERR α no controle do metabolismo energético em tumores de mama HER2 positivos, influenciando a proliferação celular desse tumor⁽¹³⁾.

Visto que a expressão de PGC-1 β influencia a proliferação de células tumorais de mama⁽¹³⁾ e que somente a linhagem SKBR3 apresentou aumento da expressão de PGC-1 β , avaliamos a influência da expressão de PGC-1 β na expressão de HER2 utilizando a técnica de RNAi, a qual é baseada no silenciamento gênico pós-transcricional de uma região de interesse. A transfecção de um RNA dupla fita no meio de cultura induz a degradação da região de interesse do RNAm através da ação de nucleases. Esse processo resulta em perda ou redução da atividade gênica da região de interesse, permitindo que essa seja investigada⁽¹⁵⁾.

Mostramos aqui que o *knockdown* de PGC-1 β não influencia a expressão gênica de HER2 e esse dado é independente de uma compensação de PGC-1 em sua isoforma α . A amplificação da região cromossômica 17q12-21 leva a superexpressão de HER2 e de diversos genes que são co-amplificados⁽¹⁶⁾. Experimentos conduzidos em células SKBR3 identificaram a ligação de PGC-1 β a diversos segmentos da região 17q12, mostrando que PGC-1 β tem importante papel na regulação da expressão de genes co-amplificados em células HER2-positivas⁽¹⁷⁾. Esses resultados mostram a importância de PGC-1 β na configuração da agressividade de tumores HER2-positivos, visto que estes estão relacionados tanto com a superexpressão de HER2 quanto a seus genes co-amplificados.

CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou maior expressão de PGC-1 β em células tumorais de mama SKBR3, um modelo HER2-positivo. Em trabalhos prévios, mostramos que a expressão de PGC-1 β interfere na proliferação celular de tumores com superexpressão de HER2⁽¹³⁾. Até o momento não há testes clínicos para modulação da expressão de PGC-1 β em tumores. Visto a importância de estudos em relação à modulação de PGC-1 β em tumores HER2-positivos, mostramos aqui que o *knockdown* de PGC-1 β não interfere na superexpressão de HER2, o qual consiste em um importante alvo terapêutico, e sua expressão não é compensada por PGC-1 em sua isoforma α . Esperamos que esse trabalho contribua para futuras pesquisas relacionadas à modulação de PGC-1 β em tumores com superexpressão de HER2, onde o tratamento com RNAi poderá ser investigado em combinação com terapias alvo-HER2.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO - World Health Organization. Health topics: Cancer. 2015.
2. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelman K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010; 28:1684–1691.
3. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Jänicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Köhler U, Lück HJ, Maass N, Possinger K, Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, Welt A. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a

german team of experts (zurich 2013). *Breast Care (Basel)*. 2013; 8(3):221-9. doi: 10.1159/000351692.

4. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013; 24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303.

5. Azambuja E, Bedard PL, Suter T, Piccart-Gebhart M. Cardiac toxicity with anti-HER-2 therapies-what have we learned so far? *Targ Oncol*. 2009; 4: 77-88.

6. Panis C, Lemos LG, Victorino VJ, Herrera AC, Campos FC, Colado Simão AN, Pinge-Filho P, Cecchini AL, Cecchini R. Immunological effects of Taxol and Adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(4):481-8. doi: 10.1007/s00262-011-1117-0.

7. Panis C, Victorino VJ, Herrera AC, Freitas LF, De Rossi T, Campos FC, Simão AN, Barbosa DS, Pinge-Filho P, Cecchini R, Cecchini AL. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011a; 133(3):881-8. doi: 10.1007/s10549-011-1851-1.

8. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, Colado Simão AN, Cecchini AL, Cecchini R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011b; 133(1): 89-97. doi: 10.1007/s10549-011-1693-x.

9. Victorino VJ, Aranome AMF, Campos FC, Herrera ACSA, Cecchini R, Panis C. Crosstalk between Oxidative Stress Signaling and HER2 Pathway in Breast Cancer. *Am J Immunol*. 2014a; 10 (4): 177-183. doi: 10.3844/ajisp.2014.177.183.

10. Victorino VJ, Campos FC, Herrera AC, Colado Simão AN, Cecchini AL, Panis C, Cecchini R. Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. *Tumour Biol*. 2014c; 35(4):3025-34. doi: 10.1007/s13277-013-1391-x.

11. Victorino VJ, Pizzatti L, Michelletti P, Panis C. Oxidative Stress, Redox Signaling and Cancer Chemoresistance: Putting Together the Pieces of the Puzzle. *Curr Med Chem*. 2014b; 21(28):3211-26.

12. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*. 1998; 92: 829-839.

13. Victorino VJ, Barroso WA, Assunção AK, Cury V, Jeremias IC, Petroni R, Chausse B, Ariga SK, Herrera AC, Panis C, Lima TM, Souza HP. PGC-1 β regulates HER2-overexpressing breast cancer cells proliferation by metabolic and redox pathways. *Tumour Biol*. 2015

14. Calderón-González KG, Valero Rustarazo ML, Labra-Barrios ML, Bazán-Méndez CI, Tavera-Tapia A, Herrera-Aguirre ME, Sánchez Del Pino MM, Gallegos-Pérez JL, González-Márquez H, Hernández-Hernández JM, León-Ávila G, Rodríguez-Cuevas S,

Guisa-Hohenstein F, Luna-Arias JP. Determination of the protein expression profiles of breast cancer cell lines by quantitative proteomics using iTRAQ labelling and tandem mass spectrometry. *J Proteomics*. 2015; 124:50-78. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.018.

15.Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(2):125-40. doi: 10.1038/nrd3625.

16.Kauraniemi P, Kallioniemi A. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(1):39-49.

17.Deblois G, Chahrour G, Perry MC, Sylvain-Drolet G, Muller WM, Giguere V. Transcriptional Control of the ERBB2 Amplicon by ERRa and PGC-1b Promotes Mammary Gland Tumorigenesis. *Cancer Res*. 2010; 70:10277-10287. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2840.