

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYANA SCHULTZ JUCOSKI

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM CARCINOMAS
PRIMÁRIOS DE MAMA

CURITIBA

2014

TAYANA SCHULTZ JUCOSKI

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *CCND1* EM CARCINOMAS
PRIMÁRIOS DE MAMA

Monografia apresentada à disciplina de
Estágio Supervisionado como requisito à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Enilze Maria de
Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientador: Prof^o Dr^o Iglénir João Cavalli

Depto de Genética - UFPR

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

À Instituição UFPR, muito obrigada pela oportunidade de um ensino de qualidade.

Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica que me permitiu adentrar ao mundo científico e possibilitou muitos aprendizados.

Aos meus pais, Andréa e Edson, pelo apoio em todos os momentos, pelo suporte, pelo ombro, pelos conselhos e amor incondicional.

À minha irmã Natália, que foi parceira de “gordice” sempre que eu estava estressada com a faculdade.

À toda minha família, pelo apoio nos momentos alegres e de angústia passados nestes cinco anos.

Às minhas queridas amigas, Adriana, Ana Carolina, Anna Cecilia, Anna Julia, Carolina, Caroline, Heloísa, Lorena, Marcella, Nicole, Renata e Sirlei, que fizeram dos meus dia-a-dia corridos melhores, que me proporcionaram momentos de felicidade e risadas, que ouviram meus desabaços e enxugaram minhas lágrimas em muitos momentos.

Ao Luca, que se tornou meu porto seguro, por sempre ouvir meus desabaços, por me fazer sorrir, por acreditar em mim, pelos conselhos e pelo apoio.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, que me auxiliaram e ensinaram muito durante meu estágio. Principalmente à Cíntia, que me auxiliou no desenvolvimento da monografia, e à Talita, que sempre tinha uma palavra e um abraço carinhoso para me acalmar.

À Prof^a Dr^a Enilze Ribeiro e ao Prof Dr Iglénir João Cavalli, pela orientação, conselhos e ensinamentos.

À secretária do curso de Ciências Biológicas, Rosane, pelo auxílio carinhoso durante o curso.

Aos muitos dos excelentes professores do curso de Ciências Biológicas, que foram de grande importância para a minha formação, pelos conhecimentos transmitidos, pelos momentos de descontração.

“...mais sábio é aquele que sabe que não sabe...”

Sócrates

RESUMO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres e corresponde a 22% dos novos casos de câncer a cada ano. Possui características moleculares e histopatológicas distintas, além de variabilidade genética. Caracteriza-se pelo desenvolvimento anormal de células da mama, cuja elevada multiplicação resulta na formação de tumor. Células cancerosas apresentam alterações na expressão e no número de cópias de diversos genes promovendo a redução ou aumento da expressão de proteínas que contribuem para o estabelecimento e progressão do câncer. No câncer de mama, o gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13.3 e envolvido no ciclo celular, apresenta-se amplificado em cerca de 15-20% das pacientes. Neste estudo foi realizada a análise do número de cópias deste gene relacionando os resultados obtidos com os dados clínico histopatológicos com o objetivo principal de avaliar sua influência no processo de metástase. O estudo foi realizado com 102 amostras de pacientes, predominantemente euro-descendentes, provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças. As amostras foram divididas de acordo com a presença (68) ou ausência (34) de metástase em linfonodo axilar. A extração do DNA dos tumores sólidos foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio e a análise de alterações do número de cópias por PCR quantitativa em tempo real utilizando o ensaio *TaqMan® Copy Number Assays (Life Technologies™)*. Os dados obtidos foram analisados pelos softwares *Copy Caller (Life Technologies™)* e *GraphPad Prism 5*. Na análise do número de cópias do gene em estudo todas as amostras apresentaram ganho, resultado que corrobora a literatura. Para todos os parâmetros clínico histopatológicos analisados não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes com e sem metástases. Este estudo sugere que o gene *CCND1* está amplificado em pacientes portadoras de carcinoma mamário, porém, não se mostrou um fator predominante no processo metastático.

Palavras-chave: câncer de mama, número de cópias, gene *CCND1*, metástases.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	- Proteinase quinase B (PKB)
AR	- Receptor de androgênio
AP-1	- Ativador de proteína-1 (Fator de transcrição do promotor de <i>CCND1</i>)
BRCA1	- Gene câncer de mama 1
BRCA2	- Gene câncer de mama 2
CCND1	- Gene da Ciclina D1
CDC6	- Proteína do controle da divisão celular homologa 6
CD24	- Agrupamento de diferenciação 24
CDK	- Quinase dependente de ciclina
CKS	- Quinase dependente de ciclina de subunidade reguladora
CNA	- <i>Copy Number Alteration</i> – Alteração do número de cópias
CNV	- <i>Copy Number Variation</i> – Variação do número de cópias
Ct	- <i>Cycle Threshold</i> – Limiar
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxinucleotídeos trifosfato
D1a	- Transcrito isoforma a de Ciclina D1
D1b	- Transcrito isoforma b de Ciclina D1
E2F	- Fator de transcrição
EGF	- Fator de crescimento epidérmico
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMS1	- Gene da Cortactina
EMT	- Transição epitelial-mesenquimal
ER	- Receptor do hormônio estrogênio
E1A	- Adenovirus E1
Fos	- <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>

GSK3β	- Glicogênio sintase quinase-3 β
G₀	- Fase de quiescência do ciclo celular
G₁	- Fase de <i>gap</i> 1 do ciclo celular
G₂	- Fase de <i>gap</i> 2 do ciclo celular
HER2	- Oncogene fator epidérmico 2 (<i>ERBB2</i>)
HNSG	- Hospital Nossa Senhora das Graças
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
Jun	- Proto-oncogene jun
kb	- kilobase
LabCHO	- Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética
LOH	- Perda de heterozigose
MDM2	- <i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEK	- MAPK quinase
MGB	- <i>Minor groove binder</i>
mRNA	- RNA mensageiro
MTDH	- <i>Metadherin</i>
mTOR	- Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MYC	- <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NC	- Número de Cópias
NF-κB	- Fator nuclear kappa B
ng	- Nanograma
OMS	- Organização Mundial da Saúde
p16	- Proteína inibidora de ciclina dependente de quinase
p21/cip1	- Proteína regulatória do ciclo celular
p63	- Proteína de tumor 63

p300	- Histona acetiltransferase p300
PAK1	- <i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PI3K	- Fosfatidiosil-3-quinase
PR	- Receptor do hormônio progesterona
pRB	- Proteína do retinoblastoma
PTEN	- Homólogo de fosfatase e tensina
RAS	- Proto-oncogene Ras
RB	- Gene do retinoblastoma
Raf	- Proteína quinase serina/treonina específica
RNA	- Ácido ribonucléico
qPCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S6K1	- Proteína ribossomal S6 quinase 1
S	- Fase de síntese de DNA no ciclo celular
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
SRC	- Receptor coativador de esteróide
Tcf/Lef	- Fatores de transcrição
TNM	- Classificação de tumores malignos Tumor-Nódulo-Metástase
TOP2A	- DNA topoisomerase 2 alfa
TPAM	- Tumores primários com ausência de metástase em linfonodo axilar
TPPM	- Tumores primários com presença de metástase em linfonodo axilar
TP53	- Gene da proteína p53
TRAF4	- <i>TNF receptor-associated factor 4</i>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
μl	- Microlitro
χ²	- Teste estatístico qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 CÂNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA.....	13
2.2 ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	16
2.3 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA.....	17
2.4 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA.....	19
2.5 PROGRESSÃO TUMORAL E METASTATIZAÇÃO.....	22
2.6 GENE <i>CCND1</i> E A CICLINA D1	25
2.7 ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS.....	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 COLETA DO MATERIAL E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	34
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	35
4.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	36
4.3.1 qPCR para avaliação do número de cópias	36
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 IDADE	41
5.2 GRAU DO TUMOR	42

5.3 RECEPTORES HORMONAIIS.....	43
5.3.1 Receptor de Progesterona	43
5.3.2 Receptor de Estrogênio.....	44
5.4 ONCOGENE <i>HER2</i>	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado e rápido das células, resultando na formação de tumores e na aquisição da capacidade de invadir tecidos e órgãos formando metástases. Resulta de um acúmulo de mutações gênicas e cromossômicas, além de alterações epigenéticas e fatores ambientais que levam ao aumento da taxa da proliferação e do dano celular, o que acaba interferindo no sistema que é responsável pelo crescimento e morte celular (NUSSBAUM *et al.*, 2001; VIEIRA, 2007).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer que mais acomete as mulheres, sendo apenas menos frequente que o câncer de pele não melanoma. Segundo o INCA (2012) essa neoplasia representou 25% (1,67 milhão) dos novos casos de câncer que foram diagnosticados em mulheres sendo que para o ano de 2014 foram estimados 57.120 novos casos para o Brasil (FIGURA 1). Além disso, também é considerado como a principal causa de morte por câncer na população feminina (KAMANGAR *et al.*, 2006). Atualmente a sobrevida é de 85% nos países desenvolvidos e está entre 50 e 60% naqueles em desenvolvimento (INCA, 2014). O número de casos de câncer de mama tem aumentado de maneira exponencial com a idade, fatores genéticos, reprodutivos e ambientais, apresentando incidência mundial crescente (VIEIRA, 2007). Ainda segundo o INCA (2014), mais de 80% dos cânceres de mama apresentam origem do epitélio ductal em comparação àqueles originados do epitélio lobular.

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos	%	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Côlon e Reto	17.530	6,4%
Côlon e Reto	15.070	5,0%	Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%	Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%	Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%	Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2014 POR SEXO, EXCETO O CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA. (Os números foram arredondados para 10 ou múltiplos de 10). Fonte: INCA (2014).

O câncer de mama é uma doença onde as células epiteliais e estromais do tecido mamário passam a ter alterações tanto histopatológicas quanto moleculares, o que permite determinar sua malignidade. No entanto, não é considerado uma doença única e sim um conjunto de doenças que apresentam variabilidade genética, características histopatológicas distintas além de uma variedade de resultados prognósticos diferenciais (VARGO-GOGOLA & ROSEN, 2007). Pode ser considerado como de bom prognóstico se for diagnosticado e tratado precocemente enquanto que o diagnóstico tardio é um dos responsáveis pela manutenção das taxas de mortalidade elevadas resultantes de seu desenvolvimento (THULER & MENDONÇA, 2005).

Alterações no número de cópias (CNA, do inglês: *Copy Number Alteration*) de DNA são ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos comumente observados no genoma do câncer como decorrência de mutações somáticas que aconteceram ao longo do desenvolvimento neoplásico (COOPER *et al.*, 2008). As CNAs são de grande interesse no entendimento da biologia tumoral uma vez que apresentam uma associação com a desregulação da expressão de oncogenes e/ou genes supressores de tumor. O oncogene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13.3, apresenta alterações no número de cópias do DNA que levam a uma desregulação da progressão do ciclo celular de G1 para S. Esta alteração no DNA correlaciona-se com o processo de progressão tumoral e metastatização podendo promover o desenvolvimento do câncer primário (IAFRATE *et al.*, 2004 REDON *et al.*, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer é uma doença multifatorial, em que fatores casuais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar o processo de carcinogênese.

Os mecanismos de promoção tumoral podem contribuir para a progressão de três modos diferentes: 1- os promotores podem estimular a expansão clonal gerando grandes populações celulares em que diferentes eventos de baixa probabilidade tornam-se possíveis; 2- visto que a proliferação celular necessita de replicação do DNA e que esse pode gerar cópias incorretas em uma baixa frequência, agentes que favoreçam a proliferação celular são indiretamente mutagênicos. Além disso, as repetitivas divisões celulares realizadas pelas células cancerosas levam a outras ameaças ao genoma celular, uma vez que eventos de recombinação mitótica juntamente com a segregação errônea dos cromossomos provocam eventos de perda de heterozigose (LOH) aumentando a contribuição de genes supressores de tumor na progressão do tumor; 3- a sequência de ciclos repetitivos de crescimento e divisão induzem a diminuição progressiva do DNA telomérico em células tronco (HANAHAN & WEINBERG, 2000; WEINBERG, 2008)

Um modelo que foi proposto para a formação do câncer é a teoria monoclonal. Segundo esta teoria, os tumores possuem origem em uma célula diferenciada cujas células clonais acumulariam diversas mutações acarretando falhas da regulação do ciclo celular e aumento da capacidade de proliferação. Estas células acabam adquirindo um potencial proliferativo ilimitado, assim como uma capacidade invasiva e de metastatização, todas estas características são fundamentais para os processos de iniciação e progressão tumoral (NOWEL, 1976).

A evolução do câncer de mama envolve a progressão por meio de estágios clínicos e patológicos diferenciais, iniciando com uma hiperplasia epitelial atípica com hiperproliferação ductal, posteriormente evoluindo a carcinoma *in situ* e invasivo, e por fim resultando em um estado de câncer metastático. Estes eventos representam o modelo hipotético de progressão tumoral (POLYAK, 2007). Os ductos mamários normais são compostos de membrana basal e uma camada formada de células epiteliais e mioepiteliais luminais, enquanto que o estroma é composto por fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e células endoteliais. No estágio de carcinoma *in situ* as células mioepiteliais sofrem alterações fenotípicas e

epigenéticas reduzindo sua quantidade nos ductos provavelmente por causa da degradação da membrana basal e aumento das células estromais. A partir do momento em que há a perda da membrana basal as células tumorais tem a oportunidade de invadir os tecidos vizinhos evoluindo para o carcinoma invasivo. A circulação destas células no organismo pode levar a sua colonização em órgãos distantes levando a formação de metástases (FIGURA 2). Esta sequência de eventos ocorre na maioria dos casos, porém nem todos os tumores se desenvolvem seguindo esta linha de progressão, podendo não exibir alguns dos estágios expostos acima (BALMAIN, GRAY & PONDER, 2003).

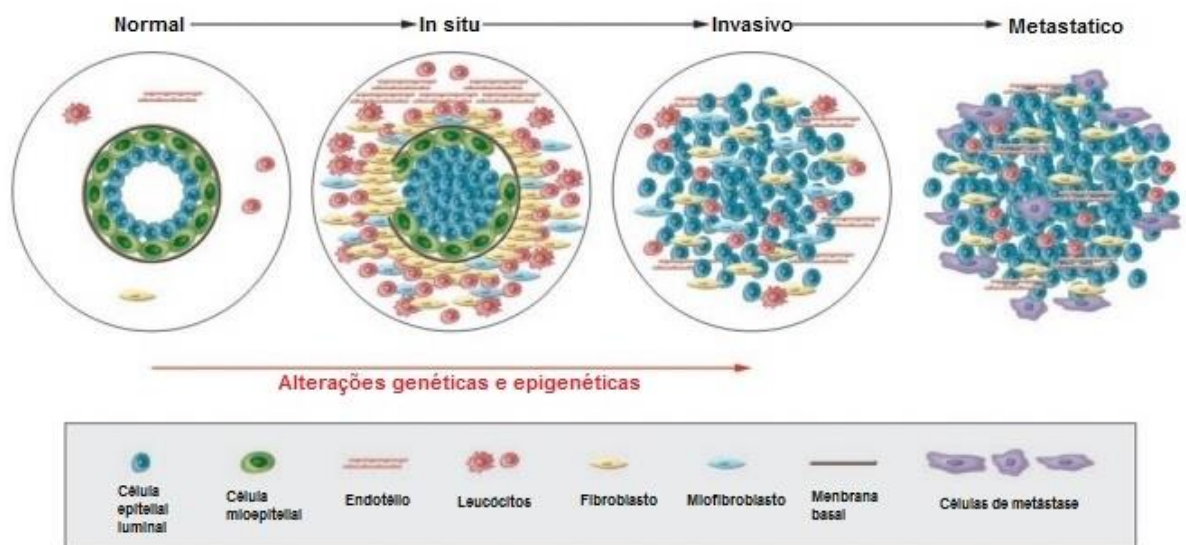


FIGURA 2 - ESQUEMA DO MODELO LINEAR DE PROGRESSÃO TUMORAL. A estrutura normal de ductos da mama sofre alterações nas células que a compõem passando a formar um carcinoma *in situ*, que com a perda da membrana basal se torna invasivo e por fim, as células adquirem capacidade de migração e metastatização. Fonte: Polyak, 2007.

Os esquemas de progressão clonal propostos até agora indicam que todas as células dentro de uma massa tumoral, participantes de uma expansão clonal determinada, são geneticamente idênticas entre si e a formação do tumor acontece em decorrência de uma série linear dessas mutações clonais. À medida que ocorre a progressão tumoral, os genomas dos tumores comumente se tornam muito mais instáveis e as taxas de mutações que são adquiridas durante cada geração de células também aumentam em alto grau. Em decorrência disso, ao invés de parecer uma série linear de sucessões clonais, a progressão tumoral atua em diversas

massas tumorais, onde o número de células que seriam subclones geneticamente distintos passam a coexistir dentro de uma única massa tumoral (WEINBERG, 2008).

A partir da sugestão destes eventos os estudos têm cada vez mais focado na análise da expressão de genes envolvidos na aquisição e perda de características criando perfis genéticos que possam ser usados para diferenciar os carcinomas *in situ*, invasivo e metastático.

2.1 CÂNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA

O desenvolvimento de medidas efetivas para a prevenção e controle do câncer se fazem necessárias uma vez que sua incidência tem se apresentado crescente ao redor do mundo. Contudo, para que estas medidas sejam desenvolvidas, ter conhecimento de sua incidência, mortalidade e causas passam a ser de extrema importância.

Segundo estimativas do Projeto Globocan, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em 2012. De acordo com este projeto da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais frequente na população feminina, com a estimativa de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados no ano de 2012, representando 25% de todos os tipos de câncer. Este tipo de câncer também é classificado como a quinta causa de morte por câncer em geral, 522.000 mortes, e como a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres das regiões menos desenvolvidas, representando 14,3% do total, e a segunda causa de morte por câncer em regiões mais desenvolvidas, sendo 15,4% do total, depois do câncer de pulmão.

Para o ano de 2030, a estimativa global de novos casos de câncer é de 21,4 milhões e 13,2 milhões de mortes por esta doença. Esse aumento nas estatísticas está relacionado com alguns fatores como o crescimento e envelhecimento da

população, a redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, o INCA estima para o ano de 2014 uma ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo aqueles de pele não melanoma que será o mais incidente na população brasileira com 182 mil casos novos. Os tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) são os tipos de câncer que apresentarão maior número de casos para 2014-2015 no país.

Os cânceres de mama podem ser considerados esporádicos (90-95% dos casos) ou hereditários (5-10% dos casos) quando se identifica um forte componente familiar. As causas do câncer de mama são diversas e não totalmente conhecidas. Os estudos da epidemiologia desta doença indicam alguns fatores de risco que podem estar relacionados com a susceptibilidade para seu desenvolvimento, sendo que estes podem ser endógenos e exógenos. Alguns desses fatores são: envelhecimento, história familiar de câncer de mama, consumo de álcool, sedentarismo, alta densidade do tecido mamário, fatores relacionados a vida reprodutiva da mulher (uso de anticoncepcional, idade de menopausa e menarca, número de gestações), excesso de peso e exposição à radiação ionizante. Há um aumento de cerca de duas a três vezes para o desenvolvimento do câncer de mama se a mulher possuir um histórico familiar positivo. A alteração em alguns genes também é responsável no aumento desse risco, mesmo sendo na maioria das vezes raro. Porém a maioria dos casos de câncer de mama ocorrem entre mulheres que não apresentam uma história familiar dessa neoplasia.

A origem no epitélio ductal da mama representa mais de 80% dos casos de desenvolvimento do câncer de mama, sendo aqueles de origem no epitélio lobular menos frequentes. Nas últimas décadas a sobrevivência de mulheres afetadas vem crescendo tanto em países desenvolvidos (85% em cinco anos) quanto nos países em desenvolvimento (entre 50-60%) (INCA, 2014). Tais dados estão relacionados à identificação do câncer de mama, que se for diagnosticado e tratado precocemente tem grandes chances de recuperação, enquanto que um diagnóstico tardio em estado já avançado da doença são os responsáveis pelas altas taxas de mortalidade.

A prevenção inicial do câncer de mama é de grande importância uma vez que medidas como uma alimentação saudável, manutenção do peso ideal, prática

regular de alguma atividade física podem auxiliar na redução do desenvolvimento desta neoplasia. Segundo o INCA, 30% dos casos de câncer de mama podem ser evitados por medidas como estas. O Brasil apresenta a mamografia bienal e o exame clínico das mamas como uma estratégia para a detecção precoce do câncer de mama, mulheres a partir dos 40 anos já são indicadas a fazer estes exames e àquelas que apresentam um alto risco conhecido de desenvolvimento deste tipo de câncer se recomenda a realização destes exames a partir dos 35 anos de idade.

Nos últimos anos tem se desenvolvido outros métodos que podem auxiliar no entendimento e na escolha do melhor tratamento de mulheres que desenvolveram o câncer de mama. Testes como *Breast Cancer Oncotype DX®* e *Symphony™ Genomic Breast Cancer Profile* apresentam um perfil de genes que são geralmente alterados no câncer de mama e tem como papel auxiliar os médicos na tomada de decisão do melhor tratamento para aquela paciente de acordo com os resultados obtidos.

O teste *Breast Cancer Oncotype DX®* foi desenvolvido pela *Genomic Health* e analisa a atividade de 21 genes relacionados com o desenvolvimento do câncer de mama podendo prever o potencial benefício da quimioterapia, assim como a probabilidade de recorrência do câncer tanto para o câncer de mama *in situ* quanto para o invasivo. A partir de uma amostra do tecido tumoral, já removido em cirurgia inicial, este teste avalia a expressão de alguns genes gerando um *Score®* entre 0 e 100 e dois gráficos que indicarão baixa ou alta probabilidade de recorrência do câncer na mesma mama. Portanto este teste é usado para se estimar o risco de recorrência do câncer de mama de estágio inicial, com receptor hormonal positivo, assim como a probabilidade de haver benefício da quimioterapia após a cirurgia (*Oncotype DX® Breast Câncer Assay* - <http://breast-cancer.oncotypedx.com/>).

O *Symphony™ Genomic Breast Cancer Profile* é um conjunto de três testes: o *MammaPrint®* (teste de recorrência que determina se a quimioterapia e seus efeitos tóxicos podem ser evitados), o *BluePrint®* (perfil molecular que fornece informações a respeito da sub-classificação do tumor orientando escolha de terapias) e o *TargetPrint®* (determina se a paciente é candidata à terapia direcionada ou hormonal) (*Agendia* - <http://www.agendia.com/>).

Assim como o organismo, os tumores também se apresentam únicos e por isso a obtenção de informações específicas de cada paciente facilita no diagnóstico e na escolha de um tratamento que seja mais eficaz. Deste modo, estes testes

permitem aos médicos avaliar a composição genômica de cada tumor de mama direcionando a terapia alvo mais indicada para o tratamento da paciente.

2.2 ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

As glândulas mamárias começam a se desenvolver logo após o período de puberdade quando ficam expostas a estimulações cíclicas de hormônios, o estrógeno e a progesterona. Seu tamanho aumenta durante o período da gravidez e atingem o máximo no período da amamentação. A glândula mamária é composta por um epitélio secretor composto de ductos (parênquima) que se formam a partir do mamilo e se espalham de maneira radial pelo estroma, que o envolve e é formado por tecido conjuntivo e adiposo além dos vasos sanguíneos e linfáticos. Assim a mama feminina é formada basicamente por lóbulos (glândulas responsáveis pela produção de leite), pelos ductos e estroma, que é composto por tecido gorduroso e conectivo além de vasos linfáticos e sanguíneos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Hormônios e fatores de crescimento que fazem parte da matriz extracelular, que é secretada pelas células que compõem o estroma, são importantes para o funcionamento, crescimento e morfogênese da glândula mamária (DIMRI *et al.*, 2005; GUIMARÃES, 2008). Algumas modificações ocorrem ao longo do desenvolvimento da mulher, durante a puberdade, o ciclo menstrual e na gravidez como já mencionado. Depois da terceira década de vida os ductos e lóbulos acabam atrofiando, reduzindo o estroma que no caso do interlobular é substituído por tecido adiposo (OLIVEIRA, 2009).

O sistema linfático está associado à estrutura da glândula mamária (FIGURA 3) e é formado por linfonodos, que são considerados um agrupamento de células do sistema imune, que estão ligados por vasos linfáticos que transportam a linfa (CARVALHO, 2013). As células malignas da mama podem atingir os linfonodos, através dos vasos linfáticos, onde crescem e formam metástases.

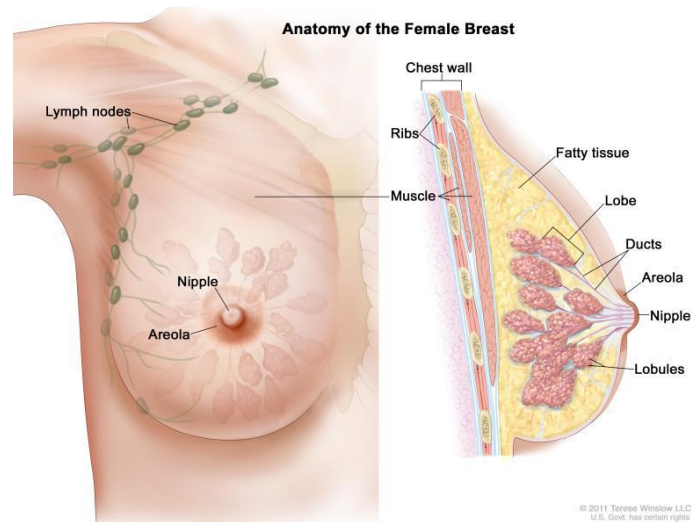


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA INTERNA DA MAMA. Fonte: Breast Cancer Treatment (PubMed Health).

Portanto, com a estrutura da mama e suas modificações durante a vida da mulher, o sistema linfático é considerado uma importante via pela qual o câncer de mama pode formar metástases regionais. Diante disso a identificação de metástases nestes linfonodos é importante uma vez que indica um risco aumentado de que estas células atinjam a corrente sanguínea permitindo o desenvolvimento de metástases à distância.

2.3 GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA

Nos últimos anos a pesquisa sobre o câncer tem avançado em diversas vertentes elucidando cada vez mais as bases moleculares de seu desenvolvimento e tratamento, revelando que o câncer apresenta-se como uma doença que envolve diversas mudanças dinâmicas no genoma. Além disso, tem fornecido ferramentas para o diagnóstico molecular, monitoramento e identificação de alvos terapêuticos.

Embora os avanços no diagnóstico e tratamento para o câncer de mama tenham evoluído nas últimas décadas, alguns problemas ainda permanecem e necessitam de mais estudo. Estas dificuldades estão relacionadas com todas as etapas: prevenção, diagnóstico, recorrência, tratamento e resistência à terapia. A elucidação de todas estas etapas é difícil, uma vez que o câncer de mama é altamente heterogêneo no nível molecular e clínico.

O câncer como um conjunto de doenças com variabilidade genética apresenta um acúmulo de mutações que alteram as funções básicas da célula que passa a adquirir novos comportamentos e propriedades, podendo causar erros nos processos bioquímicos e levar à proliferação desregulada desta célula. Entre as alterações gênicas que as células cancerosas podem apresentar estão rearranjos, deleções, ampliações e mutações de ponto que são responsáveis por transformar a expressão dos chamados oncogenes e genes supressores de tumor (STORCHOVA & PELLMAN, 2004). Estas duas classes de genes, quando são mutados, podem contribuir para o estabelecimento e desenvolvimento de células cancerosas.

Mutações nos proto-oncogenes originam os oncogenes. Compõem um grupo de vários genes que apresentam papéis importantes no bom funcionamento bioquímico da célula, sendo de extrema importância para a regulação do ciclo celular e portanto associados ao crescimento, proliferação e diferenciação nas células cancerosas

Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos da proliferação celular através do bloqueio da diferenciação e também podem induzir a morte celular programada (apoptose). Assim uma mutação nestes genes permite à célula se proliferar de maneira descontrolada sem que seja barrada.

O câncer de mama pode ser esporádico, quando mutações somáticas são adquiridas por exposição a agentes carcinogênicos, ou hereditário, quando as mutações são germinativas e repassadas através das gerações. Neste segundo caso a história familiar auxilia na identificação do risco e na adoção de medidas preventivas. Neste tipo de câncer dois genes, o *BRCA1* e o *BRCA2*, respondem por grande parte dos casos. Seus produtos atuam na manutenção da integridade genômica exercendo papel na carcinogênese. Segundo Narod e Foulkes (2004), as mutações no *BRCA1* e *BRCA2* representam 5% de todos os cânceres de mama e 50% dos cânceres de mama hereditários. Em média, o risco da mulher que apresenta mutação nestes genes chega a ser de 80% segundo alguns estudos. Este risco é alto, porém pode variar de acordo com o tipo de mutação e a história familiar da mulher (THOMPSON *et al.*, 2001; ANTONIOU *et al.*, 2003; KING *et al.*, 2003). A história familiar de câncer de mama, principalmente na presença de casos de câncer de mama bilateral e masculino, está relacionada com um aumento de duas a três vezes no risco de desenvolvimento deste tipo de câncer.

Diversos genes, além destes, estão relacionados com a susceptibilidade no desenvolvimento do câncer de mama como o *PTEN*, *TP53*, *RAS*, *MYC*. A forma esporádica ocorre em média em 90-95% dos casos de câncer de mama devido a mutações somáticas em genes como o proto-oncogene *ERBB2 (HER2)* (GALVÃO *et al.*, 2011). Este gene, assim como outros não citados e aqueles que vem sendo descobertos como alterados no câncer de mama são estudados para a elucidação dos mecanismos de ação do câncer e também para investigação de possíveis pontos em que uma intervenção seria possível. A busca por alvos terapêuticos e desenvolvimento de drogas específicas capazes de eliminar as células tumorais sem que cause injúria nas células saudáveis tem sido o principal foco das pesquisas atuais no câncer. No entanto ainda persiste a necessidade de pesquisas que tenham como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre as bases moleculares e bioquímicas desta neoplasia para que se possa desenvolver métodos prognósticos, diagnósticos e tratamentos cada vez mais sensíveis e precisos.

2.4 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

Uma neoplasia heterogênea como o câncer de mama apresenta diversos subtipos com diferentes aspectos histológicos, distintas manifestações clínicas, resultando em diferentes respostas aos procedimentos terapêuticos (VIEIRA, 2007). Essa diversidade se torna um desafio para a classificação deste tipo de câncer, na predição de um prognóstico e/ou sobre o comportamento do tumor (PARKER, 2009). Atualmente a classificação morfológica tem se mostrado insuficiente quanto à caracterização do câncer de mama desde que tumores que apresentam o mesmo tipo histológico, estágio ou grau podem ter diferentes prognósticos e resposta à terapia (VIEIRA, 2007).

A classificação do câncer de mama pelo Sistema de Classificação de Tumores Malignos (TNM) foi criado por Pierre Denoix (1952) e é baseada em três componentes: extensão do tumor - **T**, a ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais - **N** e a ausência ou presença de metástases à distância - **M** (TNM: CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS, 2004). Além

disso, adiciona-se um número a estas categorias que é referente à extensão da doença.

O câncer de mama também pode ser classificado quanto a sua localização, podendo ser *in situ* ou invasor.

O carcinoma ductal *in situ* é o tipo de carcinoma não invasivo mais comum em que ocorre a proliferação de células do epitélio ductal maligno que não invade o tecido normal uma vez que é limitado pela membrana dos ductos, podendo se estender até os lóbulos (OREL *et al.*, 1997). No entanto, é considerado como uma lesão de risco, pois é capaz de evoluir para o tipo invasivo. Já os carcinomas invasivos são caracterizados por romper essa membrana basal celular permitindo a invasão de outros locais e o desenvolvimento de metástases.

Em relação à célula de origem o carcinoma pode ser ductal ou lobular. Além disso, é importante o estabelecimento de graus de diferenciação histológica, sendo I bem diferenciado e com melhor prognóstico, II moderadamente diferenciado e III pouco diferenciado e com um pior prognóstico (OLDENBURG *et al.*, 2007).

A classificação molecular do câncer de mama foi proposta por Perou e colaboradores (2000) num estudo de expressão de 1753 genes em 42 amostras de tecido mamário (células cancerosas e normais). Verificou-se que a diversidade fenotípica do câncer de mama estaria relacionada com a diversidade gênica. Assim, a classificação proposta por estes autores juntamente com subseqüentes análises (SORLIE *et al.*, 2001; 2003) mais refinadas levou à divisão do carcinoma mamário em cinco subgrupos moleculares que diferem quanto a origem, já que os tumores basais compartilham certas características moleculares com as células mioepiteliais, ao passo que os tumores luminais partilham características moleculares das células luminais. Os subgrupos sugeridos são: luminal A, luminal B, HER2 positivo, basal e semelhante ao normal. Estudos posteriores demonstraram diferenças na expressão de genes ao se comparar tumores ER+ com tumores ER-, indicando que a análise destes receptores pode subdividir os grupos moleculares levando à proposta de novas classificações (PUSZTAI *et al.*, 2003; SOTIRIOU *et al.*, 2003).

O subtipo luminal A apresenta fenótipo ER positivo e HER2 negativo, é caracterizado pela elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas (BIRNBAUM *et al.*, 2004). Este fenótipo está associado a um melhor prognóstico e sabe-se que responde à terapia com antiestrogênicos (SORLIE *et al.*, 2001). O subtipo luminal B possui

fenótipo ER positivo e HER2 positivo sendo caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais. Este fenótipo está associado a um pior prognóstico, estando particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores ER negativos (subtipos com superexpressão de HER2 e basal).

O subgrupo com superexpressão de HER2 é caracterizado pela superexpressão de uma das moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, o HER2 e é ER negativo. A amplificação deste gene juntamente com a superexpressão de sua proteína é um importante biomarcador de prognóstico para o carcinoma de mama. Portadores destes tumores apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade da proteína HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab (BERTUCCI *et al.*, 2006).

O subtipo basal apresenta o fenótipo: ER negativo e HER2 negativo sendo caracterizado pela expressão de vários genes das células progenitoras ou das células basais. Apresenta positividade para CK5, CK14, CK17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), p63, entre outros, que são proteínas expressas nas células basais (SORLIE *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2004;). Este perfil está relacionado a mutações no gene *BRCA*, e por estar associado com um pior prognóstico é o subtipo mais intrigante. Além disso, não possui alvo terapêutico definido, como os outros subtipos e não responde ao tratamento com drogas antiestrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 (VIEIRA, 2008).

O subtipo semelhante ao normal foi identificado por meio do aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos no tecido adiposo e por outros tipos de células que não são epiteliais. Apresentam forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para os genes do epitélio luminal (PEROU *et al.*, 2000). Ainda não se tem claro sua distinção e seu valor clínico.

Mais recentemente foram identificados e sugeridos mais dois subtipos. Prat e colaboradores (2010) sugeriram a existência de tumores mamários *claudin-low*, caracterizados pela baixa expressão dos genes que codificam as claudinas 3, 4 e 7, E-caderinas e CD24. Os tumores classificados neste subgrupo apresentam um aumento da expressão de genes relacionados com a transição epitelial-mesenquimal (EMT). Este grupo tem sido considerado, na verdade, como um subgrupo dos tumores triplo negativos. O outro grupo molecular que foi instituído recentemente é o de tumores apócrinos moleculares. Caracteriza-se pelo aumento

da expressão do receptor de andrógeno (AR), apresentando ER e PR negativos (VALENTIN *et al.*, 2012; DVORKIN-GHEVA & HASSELL, 2014).

Concomitante com os estudos que revelaram a heterogeneidade do câncer de mama e seus subtipos, o perfil de expressão gênica acessado pela técnica de microarranjos foi utilizado também para analisar a individualidade dos pacientes com câncer de mama, tendo como o objetivo a identificação daqueles com a doença de bom prognóstico suficiente que permita a omissão segura da quimioterapia adjuvante. Assim, nos últimos anos estes estudos possibilitaram uma modificação na maneira de se perceber o câncer de mama e permitiram enxergá-lo como um conjunto de diferentes doenças que variam entre os pacientes e necessitam de abordagens terapêuticas distintas (REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011).

2.5 PROGRESSÃO TUMORAL E METASTATIZAÇÃO

A progressão tumoral é caracterizada pelo processo no qual células normais, por meio de influências internas e externas, evoluem para células ditas neoplásicas. Tal processo é dirigido por um conjunto de mutações aleatórias juntamente com alterações epigenéticas do DNA que afetam genes que são responsáveis por controlar a proliferação, sobrevivência e outras características deste fenótipo maligno (WEINBERG, 2008). Assim a progressão tumoral se caracteriza por um aumento no tamanho do tumor e sua difusão para outros tecidos e órgãos. Tal comportamento é possível devido a propriedades que são adquiridas pelo tumor e que permitem a manutenção desse processo considerado maligno. Hanahan e Weinberg (2000) enumeraram alguns princípios que regem a transformação de células humanas normais em células que dão origem a cânceres malignos por alterarem a fisiologia celular. As capacidades adquiridas pelo câncer para manutenção do processo maligno seriam 1) autossuficiência nos processos que estimulam a divisão e o crescimento celular; 2) insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento; 3) desvio da morte celular programada; 4) aquisição de potencial

ilimitado de replicação; 5) desenvolvimento de mecanismos de auto-nutrição; 6) capacidade de invadir e colonizar outros tecidos (metastatização) (FIGURA 4).

O entendimento desse processo múltiplo permite uma compreensão de como as células iniciais do câncer se comportam e adquirem estas características que são responsáveis por torná-las primeiramente tumorigênicas e depois malignas (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Tornar essas propriedades como principais focos nas pesquisas com câncer levará a elucidação de mecanismos pelos quais as células cancerosas adquirem tais características possibilitando o desenvolvimento de estratégias e alvos terapêuticos. A grande dificuldade em combater esta neoplasia é devido à complexidade destas propriedades e a maneira como consegue manipular os processos celulares normais para sobreviver. Assim a maneira de combater-la seria saber como estas células agem e se comportam no nível mais refinado.



FIGURA 4 - ESQUEMA DAS SEIS CAPACIDADES ADQUIRIDAS POR CÉLULAS CANCEROSAS. Fonte: Hanahan & Weinberg (2000) Modificado pelo autor (2014)

Dentre estas propriedades que são adquiridas pelas células cancerosas no processo de progressão tumoral, duas delas, ativação de invasão e metástase se

mostram relacionadas à taxa de mortalidade em câncer de mama. A maioria das pacientes com câncer de mama apresenta comprometimento em locais que são distantes daquele de origem do tumor. Tal fato ocorre devido à metastatização, um processo considerado complexo em que há um crescimento descontrolado das células tumorais em locais que são distantes daquele do tumor primário levando a alterações em suas funções vitais (WEINBERG, 2008; NOLA *et al.*, 2012). Essa migração das células tumorais se dá por meio do sangue e da linfa quando se desprendem da massa tumoral primária pela aquisição da capacidade de invadir o tecido adjacente. Tal ação é possível devido à cascata invasão-metástase que se inicia com o rompimento da membrana basal pelas células do carcinoma *in situ* permitindo sua entrada em vasos sanguíneos e linfáticos que irão transportar estas células para outros locais onde irão formar micrometástases dormentes. Algumas destas adquirem habilidades de colonizar tais locais levando à formação das metástases macroscópicas. Além disso, esse rompimento da membrana basal está relacionado com a transição epitelial-mesenquimal (EMT) processo responsável por regular o desenvolvimento de metástases e permitir que as células epiteliais tenham ação invasora, e também resistir à morte por apoptose permitindo a disseminação (POLYAK & WEINBERG, 2009).

As células tronco podem acumular diversas mutações ao longo do tempo por possuírem uma longa vida com grande potencial de replicação, tal fato faz com que elas sejam células de interesse para se investigar a origem do câncer. Na glândula mamária as células tronco são requeridas para processos de renovação celular periódica e na gestação na expansão epitelial. Contudo ainda há um debate sobre a existência deste tipo de célula na mama. A ideia de que há células tronco da mama como uma população fixa não é muito bem vista e o ponto chave é que pode haver uma população de células que tenham a capacidade e algumas características das células tronco, sendo as células-tronco *like*. A aquisição dessas características por essas células seria devido a suas interações com seu microambiente (SMALLEY & ASHWORTH, 2003)

2.6 O GENE *CCND1* E A CICLINA D1

O gene *CCND1* está localizado no cromossomo 11q13.3 (FIGURA 5), possui cinco éxons e codifica a proteína CCND1, pertencente à família das ciclinas, que são altamente conservadas e se caracterizam por uma periodicidade de atuação no ciclo celular (OMIM, 2014). Os éxons podem dar origem às isoformas Ciclina D1a e Ciclina D1b por meio de *splicing* alternativo (MOTOKURA & ARNOLD, 1993; LU, GLADDEN & DIEHL, 2003; FU *et al.*, 2004). O promotor do gene *CCND1* possui sítios de ligação para os fatores de transcrição como AP-1, Tcf/Lef, Nf- κ B, que por sua vez são ativados por uma série de receptores de fatores de crescimento (WEINBERG, 2008).

Este gene foi identificado em 1991 (MOTOKURA *et al.*, 1991) e desde então diversos estudos têm focado na elucidação dos mecanismos pelos quais a Ciclina D1 atua no processo de tumorigênese em diversos tipos de câncer como os de mama, pâncreas e esôfago (BANI-HANI *et al.*, 2000; DIEHL, 2002; WIESTNER *et al.*, 2007; PESTELL, 2013; VOSE, 2013; CASIMIRO *et al.*, 2014). Vários mecanismos como superexpressão, rearranjos cromossômicos e ampliações gênicas deste oncogene foram descritos em vários tipos de câncer (BARTKOVA *et al.*, 1994; AMANATULLAH *et al.*, 2001; STACEY, 2003; WANG *et al.*, 2004).

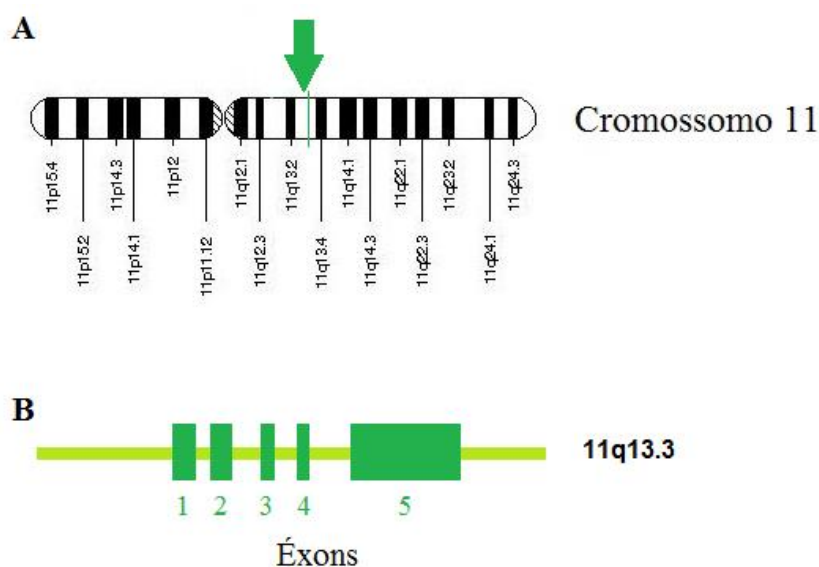


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO GENE *CCND1*. **A** - localização no cromossomo 11; **B** – éxons presentes no gene. Fonte: Genetics Home Reference. Modificado pelo autor (2014).

O “relógio do ciclo celular” consiste em uma rede de proteínas que estão sempre interagindo e recebendo sinais do ambiente intra e extracelular, integrando-os e são responsáveis por decidir o destino da célula podendo levar à proliferação ou à quiescência. No entanto os mecanismos que conduzem o ciclo celular estão sujeitos a falhas ao longo do seu funcionamento. A transição entre as fases (G₁, S, G₂ e M) são reguladas por “pontos de verificação”, mecanismo que monitora as fases do ciclo celular e impede o avanço ao longo do ciclo até que seja concluído um determinado processo decisivo, como a síntese e o reparo do DNA. Estes pontos também garantem que ao ser completada determinada etapa do ciclo celular esta não será repetida até que a célula passe ao próximo ciclo celular. Caso este processo seja realizado o ciclo celular pode passar para a fase seguinte, devido a atuação de diversas proteínas, como as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK) (WEINBERG, 2008).

Perturbações na regulação da maquinaria do ciclo celular têm sido frequentemente observadas em diversos tipos de câncer humano, sendo a Ciclina D1 um dos reguladores mais comumente alterados. Atua como um sensor mitogênico e também ativador alostérico de CDK4/6. O relato de sua superexpressão em neoplasias pode estar atribuído a vários fatores, sendo eles o aumento da transcrição do gene *CCND1*, tradução e estabilidade da sua proteína (KIM & DIEHL, 2009).

As ciclinas atuam como reguladores de quinases, formando complexos ciclinas-quinases que agem na coordenação do ciclo celular conduzindo a célula através do seu ciclo de crescimento e divisão. A ligação das ciclinas está envolvida na ativação funcional das CDKs e quando associadas orientam essas no reconhecimento de substratos protéicos na célula. Estes complexos apresentam-se desregulados em diversos tipos de câncer, contribuindo no crescimento assim como na transformação neoplásica (KIM & DIEHL, 2009). A indução da ciclina tipo D resulta da estimulação do crescimento das células em resposta a diversos oncogenes, como *RAS*, *MYC*, *E1A*, e fatores de crescimento mitogênicos, como EGF e IGF. A via de sinalização p16-ciclinaD1-CDK4-RB é a principal via relacionada com a transição G₁/S do ciclo celular sendo que alterações em qualquer nível desta via são comumente encontradas em células cancerosas. As ciclinas que atuam nesta via são a D e a E, responsáveis por controlar a progressão através do ponto de restrição durante a parte final da fase G₁, momento em que as células

ambiente que cerca a célula (SHERR & ROBERTS, 1999). No caso da CCND1 a ativação de receptores do tipo tirosina quinase e a estimulação de várias cascatas de sinalização resulta no seu rápido acúmulo na célula.

A habilidade desses fatores de crescimento mitogênicos em aumentar os níveis de ciclinas do tipo D depende de várias rotas de sinalização distintas (FIGURA 7).

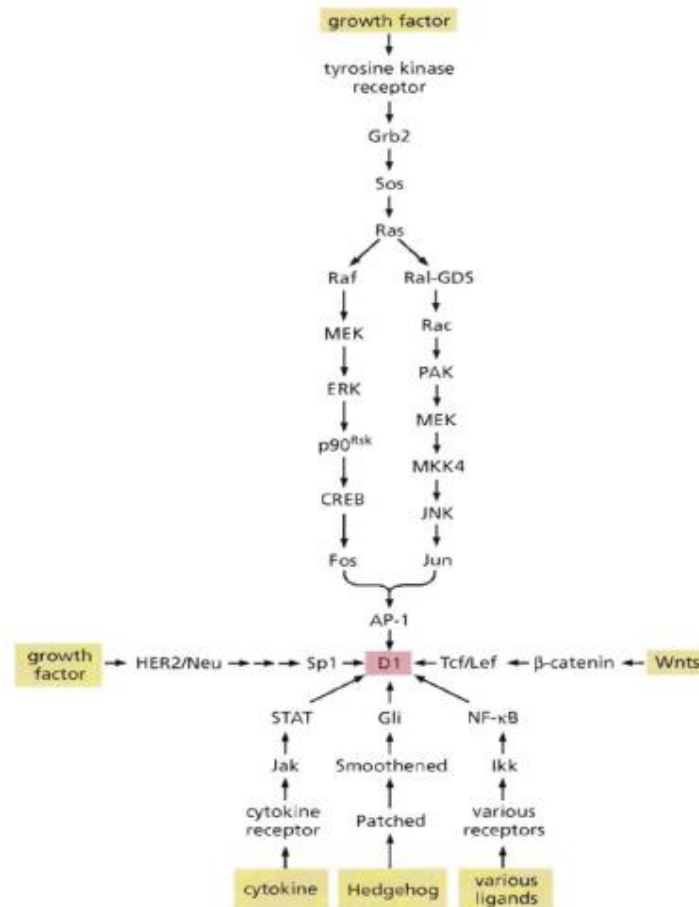


FIGURA 7 – VIAS QUE CONTROLAM O NÍVEL DA CCND1 NO INTERIOR CELULAR ATUANDO SOBRE A TRANSCRIÇÃO DE SEU GENE. FONTE: Weinberg, 2008

Após a exposição das células a estímulos mitogênicos ocorre a ativação do receptor tirosina quinase desencadeando uma cascata de sinalização que envolve Ras-Raf-MEK-ERK (quinase regulada por sinal extracelular), levando ao aumento da taxa de transcrição do gene *CCND1* (ALBANESE *et al.*, 1995; WEBER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1998; KIMAND & DIEHL, 2009). Por exemplo, membros da família de fatores de transcrição Fos, que se encontram na base dessa cascata de sinalização, formam o fator de transcrição heterodimérico AP-1 juntamente com a proteína Jun.

Esses complexos AP-1 são conhecidos por serem poderosos ativadores da transcrição do gene de Ciclina D1. Além disso, uma série de proteínas citoplasmáticas transdutoras de sinal gerado age sobre o promotor de *CCND1* de forma ainda pouco compreendida. O aumento da transcrição proporciona aumento da tradução e a redução da proteólise, que é ativado através de vias distintas as quais envolvem a PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) e Akt mediado pelo Ras, promovendo ainda mais a indução de *CCND1*. Já a elevação da tradução acontece pela cascata PI3K-Akt-mTOR-S6K1 (KOZICZAK & HYNES, 2004) e a via PI3K-Akt-GSK3 β dirige a redução da degradação da proteína. Akt medeia por fosforilação a atividade GSK3 β diminuindo a GSK3 β catalítica o que leva à inibição da degradação de exportação nuclear e citoplasmática de *CCND1* promovendo seu acúmulo nuclear e sua atividade associado a CDK durante a fase G1 (FIGURA 8).

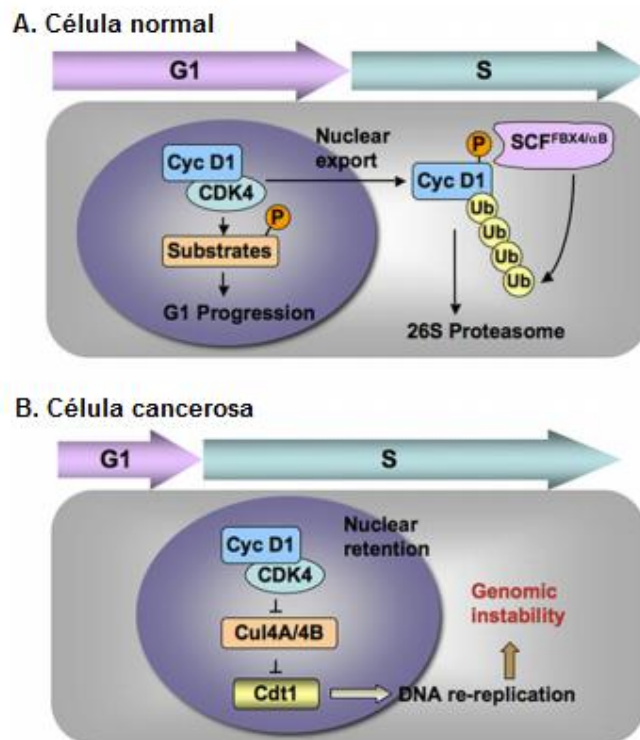


FIGURA 8 – REGULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA CICLINA D1 NA CÉLULA NORMAL (A) E CANCEROSA (B). Nas células normais *CCND1* é degradada, após a progressão de G1 para S. Enquanto que em células cancerosas, tal regulação não ocorre devido a mecanismos que promovem o aumento da atividade do complexo *CCND1/CDK4* no núcleo durante a fase S, gerando instabilidade genômica. Fonte: Kim & Diehel (2009).

Estudos têm demonstrado que a indução de Ciclina D1 em linhagens celulares de câncer de mama diminui o tempo de G1 e conseqüentemente leva a um

aumento do número de células que progridem através da fase S. Além disso, o CCND1 se mostra essencial para a progressão do ciclo celular uma vez que a entrada na fase S não ocorre caso haja inibição de CCND1 (MUSGROVE *et al*, 1994; MASSAGUE, 2004)

A proteína Ciclina D1 apresenta ainda a capacidade de interagir com o hormônio estrogênio o que a torna um componente importante na indução do câncer de mama. Assim, uma expressão aumentada desta proteína permite que as células cancerosas cresçam e também contribuem para a aquisição de resistência a terapias endócrinas (ROY & THOMPSON, 2006). Ao mesmo tempo, a Ciclina D1 ainda tem a capacidade de agir como fator de transcrição podendo regular o crescimento de tecidos que respondem à ativação do receptor de estrogênio (ER) de modo dependente do ligante, ou seja, na ausência do estrogênio (ZWIJSEN *et al.*, 1997). Tal papel se deve ao fato dela se ligar ao domínio de ligação do estrogênio no ER promovendo a associação entre este receptor e seus coativadores o que leva ao aumento da expressão de ER mediando a transcrição através de um meio independente de CDKs. Ao atuar como agonista do estrogênio na ativação do ER, a Ciclina D1 apresenta uma atividade que pode estar subjacente ao seu papel oncogênico no câncer de mama ER+.

A transativação do receptor de estrogênio é dependente da ligação de um ligante em um motivo rico em leucina. Quando essa interação ocorre os coativadores recrutam fatores de transcrição adicionais que promovem a transcrição devido a sua atividade inerente de histona acetiltransferase. O ER é incapaz de interagir com coativadores da família SRC-1 na ausência do ligante uma vez que o domínio rico em leucina está indisponível para interação. Estudos demonstraram que a proteína CCND1 é capaz de interagir com esses coativadores e atuar como um fator de ligação entre o ER e SRC levando a transativação de ER sem a necessidade do ligante estrogênio. Tal interação é possível devido à presença de um rico domínio de leucina no terminal carboxil da CCND1 possibilitando sua interação com SRC (ROY & THOMPSON, 2006) (FIGURA 9).

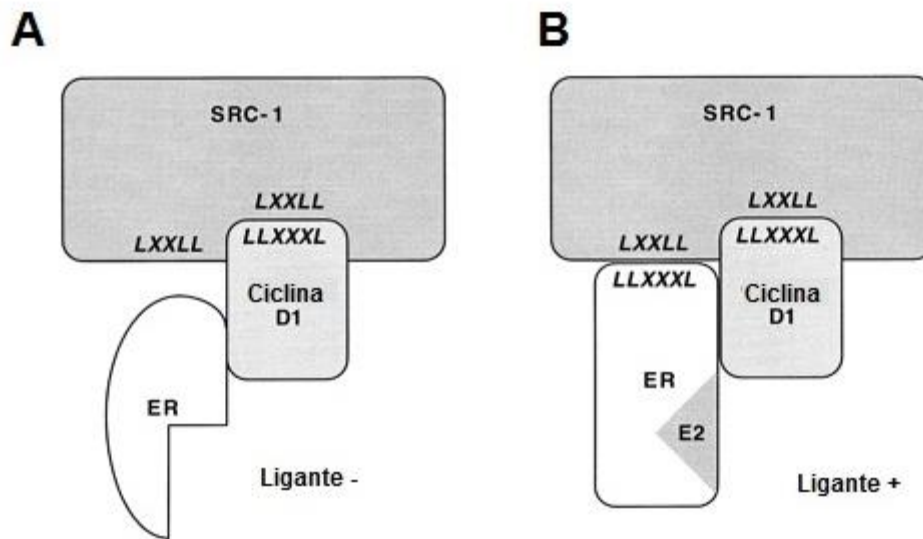


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA TRANSATIVAÇÃO DA CICLINA D1 MEDIADA POR ER. **A** – na ausência de ligante ER é incapaz de interagir com SRC e a Ciclina D1 o ativa parcialmente; **B** – na presença do ligante ER sofre uma alteração conformacional e consegue interagir com SRC ativando completamente ER. Fonte: Zwijsen *et al.*(1998).

O aumento da expressão de *CCND1* no câncer de mama é relatado entre 40 a 50% das pacientes com câncer de mama invasivo e a amplificação de seu gene é observada entre 15 a 20% dos tumores. A alta expressão do *CCND1* não está necessariamente relacionada com o aumento da quantidade da sua proteína, havendo outros mecanismos que contribuem para manter essa quantidade aumentada. O estrogênio e a TP53 através da via p21^{cip1} são fatores que contribuem para a expressão diferenciada desta proteína (ROY & THOMPSON, 2006).

Sabe-se que existe a coamplificação de diversos oncogenes no câncer de mama como *CCND1*, *MYC*, *EGFR*, *HER2* e *MDM2*. Além disso, muitos estudos sugerem que a superexpressão da ciclina D1 seria um bom fator prognóstico no câncer de mama invasivo associado a uma melhor evolução das pacientes especialmente daquelas ER+ (ROY & THOMPSON, 2006). No entanto, alguns estudos têm discordado desta evidência propondo que a amplificação do gene *CCND1* estaria relacionada com a recidiva precoce e um mau prognóstico no câncer de mama ER+ (BIECHE *et al.*, 2002). Também já existem evidências experimentais de que o aumento da expressão de *CCND1* em linhagens celulares de câncer de

mama levaram ao aumento da sensibilidade à radiação ionizante (COCO *et al.*, 1999).

Portanto, a investigação da ciclina D1 na carcinogênese mamária justifica-se pela sua evidente colaboração em diversas vias que atuam na progressão das células tumorais.

2.7 ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS

CNA pode ser definido como alterações somáticas do número de cópias de um segmento de DNA com tamanho variável entre 1 kilobase (kb) e 1 megabase (Mb) que são encontradas em uma sub-população de células clonais. Ou seja, apresentam uma alteração do número de cópias quando comparada com o DNA genômico constitucional do mesmo indivíduo (BEROUKHIM *et al.*, 2012). Essas mudanças estão presentes no genoma humano na forma de ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos (COOPER *et al.*, 2008). Análises genéticas e de citogenética tem revelado muitas dessas alterações no genoma humano desempenhando um importante papel na etiologia de doenças complexas (WEIR, ZHAO & MEYERSON, 2004).

A amplificação do gene é vista como um mecanismo comum de ativação de oncogenes em tumores sólidos. Alto nível de ganhos no número de cópias de DNA é frequentemente encontrado no câncer de mama, por exemplo, nas seguintes localizações cromossômicas 8p12, 8q24.21, 11q13.3, 11q13.5, e 17q12 afetando oncogenes como *MYC*, *CCND1*, *PAK1* e *HER2* (JÖNSSON *et al.*, 2010). Um dos objetivos da análise de CNAs é a identificação de novos genes e *loci* que podem ser associados com o risco de doenças, como o câncer, uma vez que podem incorporar sequências de genes funcionais que são as regiões codificadoras e promotoras do gene ou ainda são capazes de afetar a regulação epigenética como metilação e alvos para microRNAs e sequências não codificadoras do gene (MASSON *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se há relação entre a alteração do número de cópias do gene *CCND1* com o processo de metastatização em carcinomas primários de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar alterações no número de cópias do gene *CCND1* em dois grupos de pacientes portadoras de carcinomas primários de mama: com ausência e presença de metástases em linfonodos axilares;

Analisar os resultados obtidos em função de parâmetros clínico e histopatológicos e compará-los com a literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi realizada a análise do número de cópias do gene *CCND1* em amostras de carcinomas primários de mama cujas pacientes apresentavam ou não metástases em linfonodos axilares.

4.1 COLETA DO MATERIAL E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de carcinomas de mama utilizadas neste trabalho foram rotineiramente coletadas no momento da cirurgia no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba, Paraná. O material biológico foi obtido após as pacientes assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido para a autorização da utilização no presente estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG. As 102 amostras utilizadas, de pacientes predominantemente euro-descendentes, foram divididas em dois subgrupos amostrais de acordo com a presença (68) ou ausência (34) de metástase em linfonodo axilar. As amostras foram acondicionadas em tubos Falcon (50ml), identificados e encaminhados para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná – UFPR. No laboratório as amostras foram processadas removendo-se o tecido adiposo, tecido estromal e vasos sanguíneos com tesouras, pinças e bisturis estéreis em placas de Petri descartáveis. Após o processamento, o material biológico foi alocado em tubos tipo Eppendorf que foram armazenados em freezer – 80°C para posterior extração de DNA. Os laudos anatomopatológicos referentes às amostras obtidas foram cedidos pelos médicos da equipe e os dados repassados para uma planilha de controle do LabCHO. A tabela 1 demonstra a caracterização da amostra utilizada no presente estudo.

TABELA 1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

	Idade		Grau			ER		PR		HER2	
	<50	≥50	I	II	III	+	-	+	-	+	-
TPPM (68)^a	29	37	7	32	23	12	39	29	10	18	20
TPAM (34)^a	13	20	7	20	7	24	2	19	4	11	11
Total	42	57	14	52	30	36	41	48	14	29	31

Legenda:

TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar

TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar

()^a - Número de pacientes que apresentavam informações para os parâmetros clínicos e histopatológicos analisados.

Fonte: O autor, 2014

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração de DNA de tumores sólidos foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio seguindo protocolo já estabelecido no LabCHO.

Os tumores foram primeiramente desagregados mecanicamente e colocados em microtubos tipo Eppendorf. Em seguida 120µl de tampão de proteinase K (5x) e 60µl de proteinase K (10ug/ml), 40µl de SDS 20%, 260µl de água ultra-pura e 20µl de EDTA foram adicionados à amostra sendo incubados a 55°C por 18 horas. No dia seguinte foi adicionado às amostras fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) em mesmo volume, centrifugado e adicionado novo volume de fenol-cloroformio aos microtubos. Adicionou-se 0,2 volumes de acetato de amônio (10M) e 2 volumes de etanol absoluto gelado e as amostras foram posteriormente colocadas em freezer - 20°C. No terceiro dia as amostras eram retiradas do freezer, centrifugadas desprezando-se o sobrenadante, adicionado 1mL de etanol 70%, centrifugado desprezando-se novamente o sobrenadante e deixando por fim secar o DNA.

Após extraído o DNA foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop®2000 e diluído para a concentração de 5ng/µl.

4.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real apresenta uma quantificação de ácidos nucléicos mais precisa e com mais reprodutibilidade em comparação a técnica de PCR convencional uma vez que determina valores durante a fase exponencial da reação. Para a detecção do material amplificado há dois agentes fluorescentes que podem ser utilizados, as sondas de hidrólise marcada com fluoróforos específicos (sondas tipo *TaqMan*[®]) ou agentes intercalantes de DNA (*SYBR*[®] *Green*).

As sondas fluorescentes tipo *TaqMan*[®] são um fragmento de DNA marcado utilizado para hibridizar outra molécula de DNA detectando sequências específicas do DNA amplificado pela PCR. É um oligonucleotídeo de fita simples complementar a uma das fitas da sequência amplificada que possui um corante repórter fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3' (Manual de treinamento, *Applied Biosystems*). No primeiro momento a sonda está inteira e a proximidade entre as pontas 5' e 3' promove a supressão da fluorescência emitida pelo repórter por meio da transferência de energia pelo *quencher*. Se na reação a sequência alvo estiver presente a sonda irá se anelar e será clivada pela atividade de nucleasse 5' da *AmpliTaq*[®] *Gold DNA polimerase* separando as duas extremidades da sonda e liberando o sinal do repórter emitindo a fluorescência. O uso das sondas *TaqMan*[®] nos experimentos de qPCR permite uma maior confiabilidade dos dados uma vez que não produz fluorescência de produtos inespecíficos por apresentar alta especificidade.

4.3.1 qPCR para avaliação do número de cópias

As reações de qPCR para o número de cópias foi realizado no equipamento *Viiia 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems*[™]) utilizando o sistema de detecção por sondas de hidrólise fluorescente *TaqMan*[®]*FAM*[™]-*MGB* e *TaqMan*[®]*VIC*[™]-*TAMRA*.

Para a análise do número de cópias do DNA foram utilizados dois ensaios: *TaqMan*[®]*CopyNumberAssays* e *TaqMan*[®]*CopyNumberReference*, além do

MasterMix (Taq Gold DNA polymerase, dNTPs). Portanto esta é uma reação de PCR em tempo real duplex cujo método de quantificação relativa é usado para determinar o número de cópias relativo de um alvo de interesse em uma amostra de DNA genômico, normalizada para o número de cópias conhecido da sequência referência, que neste caso apresenta duas cópias do gene em estudo, *CCND1*.

O *TaqMan®CopyNumberAssays* detecta o gene alvo ou a sequência genômica de interesse. Apresenta dois RNAs iniciadores (*primers*) não marcados para amplificar a sequência alvo de interesse e uma sonda *TaqMan®MGB* para detectar a sequência alvo de interesse. Esta sonda apresenta um corante *FAM* repórter ligado na extremidade 5', um *quencher* não fluorescente (NFQ) e um MGB (*minor groove binder*) ligado na extremidade 3' (molécula que permite aumentar a temperatura de *Melting* utilizando sondas curtas).

O *TaqMan®CopyNumberReference* (RNASE P) detecta uma sequência que é conhecida por possuir duas cópias em um genoma diploide. Apresenta dois *primers* não marcados para amplificar a sequência referência, uma sonda *TaqMan®TAMRA* para detectar a sequência de referência. Esta sonda apresenta um corante repórter *VIC* ligado à extremidade 5' e um *quencher* TAMRA ligado à extremidade 3' (FIGURA 10).

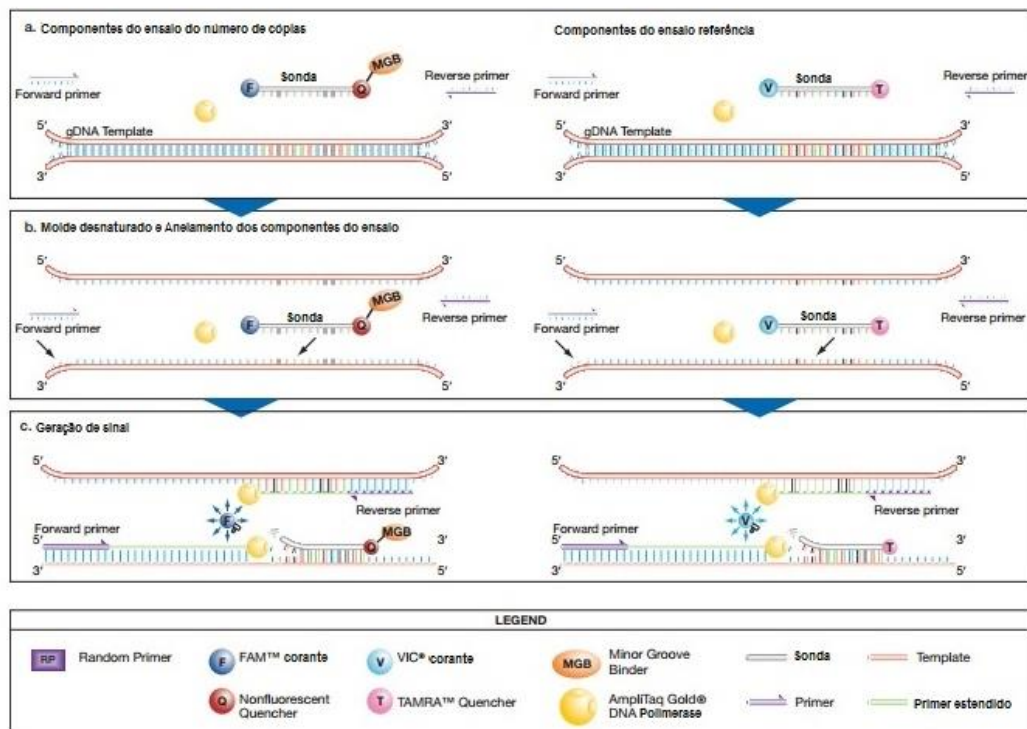


FIGURA 10 - ESQUEMA DA ATUAÇÃO DOS ENSAIOS *TAQMAN®COPYNUMBERASSAYS* E *TAQMAN®COPYNUMBERREFERENCE* NA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL. Fonte: Protocolo *TaqMan® Copy Number Assays* (Applied biosystems™)

As placas foram montadas com 30 amostras, controle positivo (NC) e controle negativo (NTC) todos em triplicata. Para cada reação foram utilizados: 2 µl de DNA (concentração de 5ng/µl), 0,5µl de ensaio do gene em estudo, *CCND1* (contendo o par de *primers* e sonda *TaqMan*®), 0,5µl de ensaio do gene da RNASE P (*primers* e sonda *TaqMan*®) e 2µl de água ultrapura, totalizando 10µl de volume de reação. As especificações do ciclo de PCR encontram-se descritos na Tabela 2.

TABELA 2 - PROGRAMA DE CICLAGEM DA PCR

Ciclos	1x	40x	
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tempo	10 min	15 seg	1 min

Fonte: O autor, 2014

Os dados obtidos através de qPCR para as alterações do número de cópias foram realizadas utilizando-se o software *CopyCaller*® (Life Technologies™). Amostras que apresentaram valor de Ct > 33 ciclos e valor de z-score ≥ 2.65 foram excluídas. O número de cópias do DNA alvo foi calculado pelo método da quantificação relativa: $2^{-\Delta\Delta CT}$ multiplicado por 2 (indivíduos diplóides). Este método é utilizado devido à padronização prévia dos ensaios que são comercializados pela empresa que fornecem uma eficiência de reação de 100%, possibilitando então que as curvas de amplificação entre os genes alvo e o gene de referência possam ser comparadas com precisão.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características analisadas no trabalho apresentam conhecida distribuição normal, sendo assim o teste *t-Student* foi utilizado para a análise de comparação entre as médias do número de cópias entre os grupos amostrais de pacientes com e sem a presença de metástase em linfonodo axilar para todos os parâmetros clínicos e histopatológicos analisados. Tais parâmetros foram: **1-** Idade (pré menopausa:

mulheres com menos de 50 anos, e pós menopausa: mulheres com 50 anos ou mais); **2-** Grau tumoral (I, II, III); **3-** Presença ou ausência de expressão do receptor de estrogênio e progesterona; **4-** Presença ou ausência de expressão do oncogene *HER2*. Além disso, os números de cópias analisados foram estratificados em duas categorias: menos de 5 cópias e 5 ou mais cópias; e o Teste do Qui-quadrado foi realizado para avaliar se os dados observados se distribuíam homogeneamente entre estes dois grupos amostrais.

5 RESULTADOS

Todas as 102 pacientes analisadas apresentaram ganho do número de cópias (NC) para o gene *CCND1*. A amostra foi subdividida em: 1) 68 pacientes que apresentaram metástase em linfonodo axilar (TPPM), desde que esse é um dos indicativos do processo de metastatização, e 2) 34 pacientes que não apresentaram metástase em linfonodo axilar (TPAM). Foi realizado o teste *t* para verificar se houve diferença significativa entre as médias do número de cópias do gene *CCND1* entre estes grupos amostrais. O resultado obtido indicou que não houve diferença estatisticamente significativa ($t'=0,85 < t_c=2,03$) entre a média do número de cópias das pacientes TPPM ($6,41 \pm 3,68$) quando comparada com a média das pacientes TPAM ($6,20 \pm 4,84$) (FIGURA 11) e também para nenhum dos dados clínicos e histopatológicos analisados.

O Teste do Qui-quadrado foi realizado para avaliar se o número de cópias estava distribuído homoganeamente entre os grupos. Assim os NC calculados foram considerados em dois grupos: com menos de 5 cópias (TPPM=30 e TPAM= 13) e amostras que apresentavam 5 ou mais cópias (TPPM=38 e TPAM=21). O valor obtido não foi estatisticamente significativo ($\chi^2=0.31$; $P>0,50$), indicando que os valores observados estão homoganeamente distribuídos nos dois grupos amostrais.

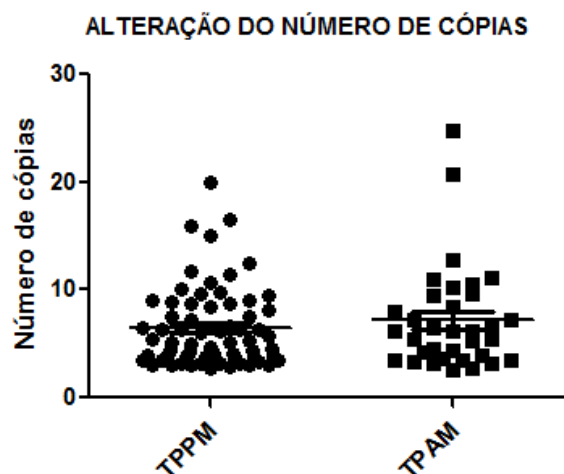


FIGURA 11 - GRÁFICO DE DISPERSÃO PARA O GANHO DO NC PARA O GENE *CCND1* ENTRE AS AMOSTRAS TPPM E TPAM.

Legenda: TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar; TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar. Fonte: O autor, 2014

5.1 IDADE

A média de idade das pacientes com metástase foi de $54,77 \pm 12,72$ anos, semelhante à das pacientes sem metástase que foi de $55,31 \pm 14,86$ anos ($t=0,003$; $P>0,95$). As pacientes foram subdivididas em pré-menopausa (mulheres com menos de 50 anos de idade) e pós-menopausa (mulheres com idades igual ou superior a 50 anos). Nas primeiras, a idade média das com TPPM foi igual a $43,62 \pm 4,45$ e das com TPAM foi igual a $42,76 \pm 5,83$, sem diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($t=0,53$; $P>0,50$). Nas pacientes em pós-menopausa a idade média das TPPM foi de $63,51 \pm 9,91$ e das TPAM igual a $65,45 \pm 11,71$, sem que a diferença tenha sido estatisticamente significativa ($t=0,55$; $P>0,50$). As médias do NC não apresentaram diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos grupos analisados: Total de pacientes com TPPM= $6,36 \pm 3,63$ e pacientes com TPAM= $7,20 \pm 4,91$ ($t'=0,20 < t_c=2,03$); pacientes em pré-menopausa: TPPM= $6,21 \pm 3,37$ e TPAM= $7,80 \pm 4,95$ ($t=1,22$; $P>0,20$) e pacientes em pós-menopausa: TPMM= $6,48 \pm 3,87$ e TPAM= $6,81 \pm 4,98$ ($t=0,27$; $P>0,80$) (FIGURA 12).

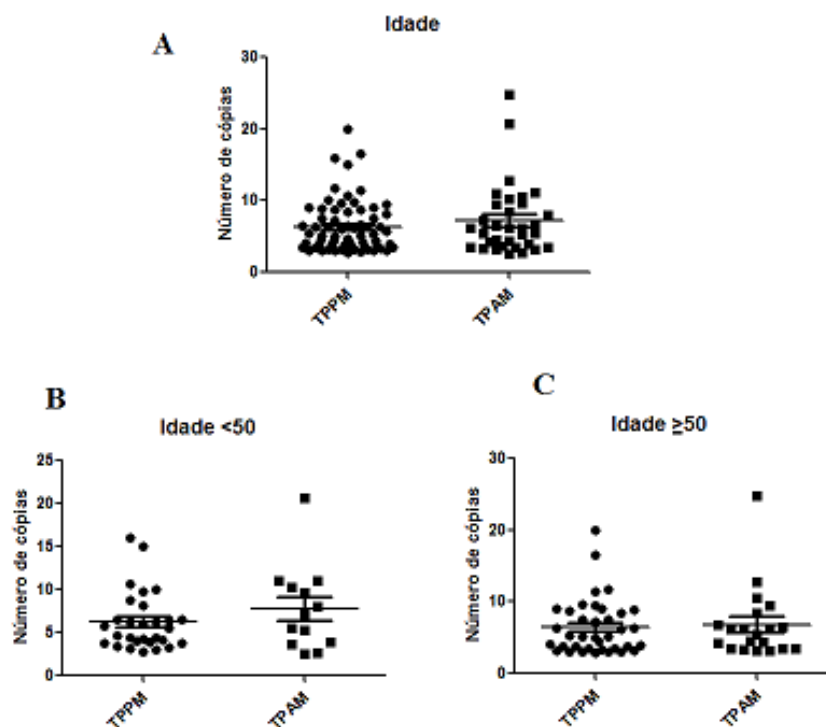


FIGURA 12 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O GANHO DO NC DO GENE *CCND1* ENTRE PACIENTES TPPM E TPAM PARA A IDADE NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO. **A:** Idade para o total de pacientes, **B:** Pré-menopausa (<50 anos), **C:** Pós-menopausa (≥ 50 anos).

Legenda: TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar; TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar. Fonte: O autor, 2014

5.2 GRAU DO TUMOR

Das pacientes TPPM com informações sobre o grau do tumor, 7 apresentaram tumores de grau I, 32 apresentaram tumores de graus II e 23 apresentaram tumores de grau III. As médias do NC foram, respectivamente, iguais a $7,12 \pm 6,11$; $6,18 \pm 3,41$ e $6,60 \pm 2,86$. Das pacientes TPAM com informações sobre o grau do tumor, 7 apresentaram tumores de grau I; 20 de grau II e 7 de grau III, com médias de NC, respectivamente, iguais a $6,45 \pm 2,14$; $7,57 \pm 5,89$ e $6,90 \pm 3,65$. A diferença entre as médias de cada um dos graus de tumor das pacientes TPPM e TPAM não foi estatisticamente significativa ($t=0,27$; $P>0,70$; $t'=0,96 < t_c=2,07$ e $t=0,21$; $P>0,80$, respectivamente para os graus I, II e III) (FIGURA 13).

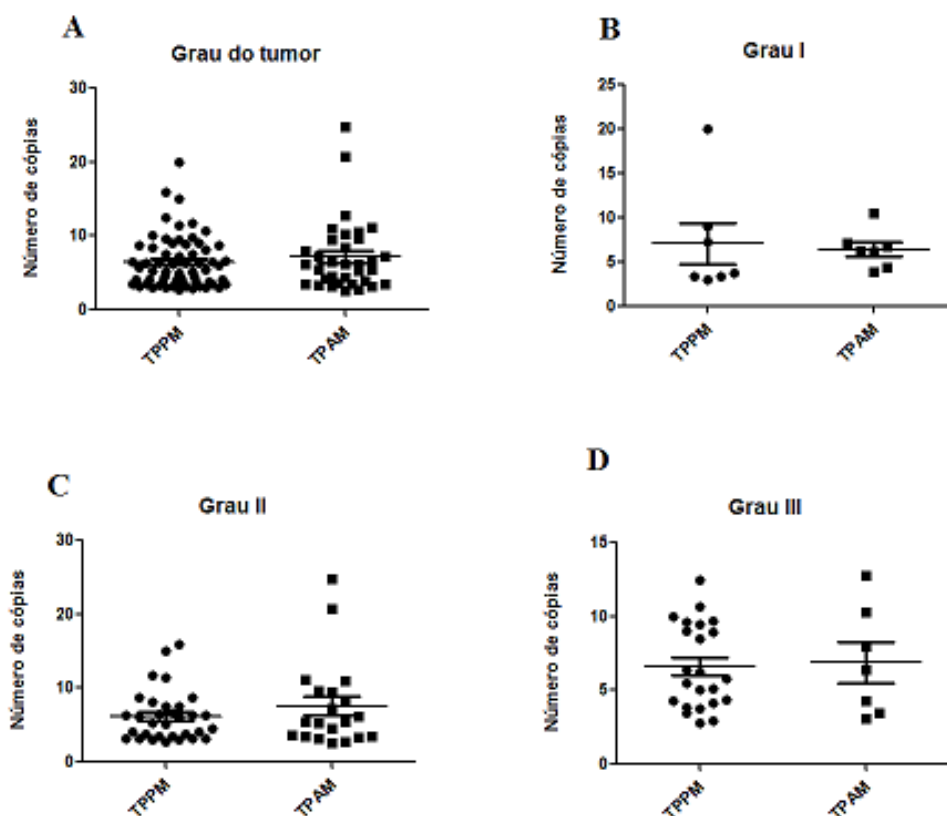


FIGURA 13 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O GANHO DO NC DO GENE *CCND1* ENTRE PACIENTES TPPM E TPAM COM DIFERENTES GRAUS DE TUMOR. **A:** Grau para o total de pacientes; **B:** Grau I; **C:** Grau II; **D:** Grau III.

Legenda: TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar; TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar. Fonte: O autor, 2014

5.3 RECEPTORES HORMONAIS

5.3.1 Receptor de Progesterona

Das 39 pacientes TPPM, 29 apresentaram expressão do receptor de progesterona (positivas) e 10 não apresentaram (negativas). As médias do NC foram, respectivamente, iguais a $7,00 \pm 4,40$ e $6,14 \pm 3,69$. Das 23 pacientes TPAM, 19 foram positivas e 4 negativas para a expressão do receptor de progesterona, com médias de NC, respectivamente, iguais a $7,34 \pm 5,79$ e $6,63 \pm 3,12$. A diferença entre as médias para a análise do total de pacientes e de cada um dos grupos de PR das pacientes TPPM e TPAM não foi estatisticamente significativa ($t=0,35$; $P>0,70$; $t=0,23$; $P>0,80$; $t=0,28$; $P>0,70$, respectivamente para a análise total, positivo e negativo) (FIGURA 14).

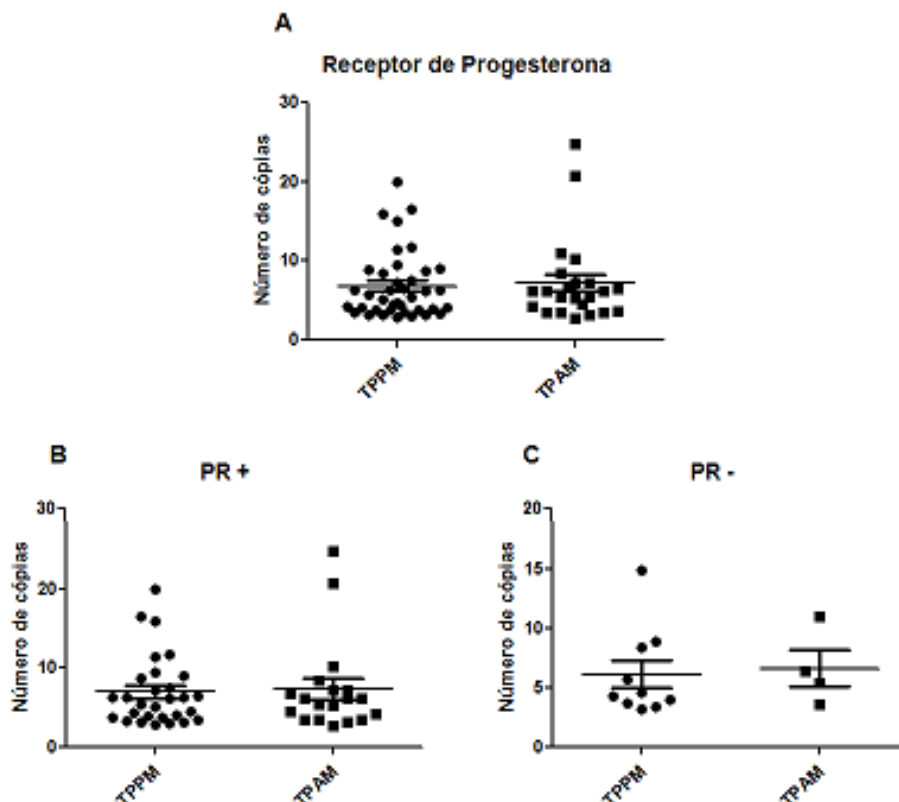


FIGURA 14 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O GANHO DO NC DO GENE *CCND1* ENTRE PACIENTES TPPM E TPAM EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE PR. **A**: total de pacientes, **B**: PR positivo, **C**: PR negativo.

Legenda: TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar; TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar; PR – receptor de progesterona. Fonte: O autor, 2014.

5.3.2 Receptor de Estrogênio

Das 51 pacientes TPPM, 39 apresentaram expressão do receptor de estrogênio (ER) e 12 não apresentaram. As médias do NC foram, respectivamente, iguais a $6,55 \pm 4,20$ e $5,81 \pm 2,66$. Das 26 pacientes TPAM, 24 foram positivas e 2 negativas para o receptor de estrogênio, com médias de NC, respectivamente, iguais a $6,95 \pm 5,38$ e $8,22 \pm 3,91$. A diferença entre as médias para a análise geral e do grupo positivo para a presença de ER das pacientes TPPM e TPAM não foi estatisticamente significativa ($t=0,61$; $P>0,50$; $t'=0,32$; $P>0,70$, respectivamente para a análise do total de pacientes e pacientes positivas) (FIGURA 15). O Teste *t-Student* não foi realizado para o grupo negativo para a presença deste receptor uma vez que este era composto por apenas duas pacientes.

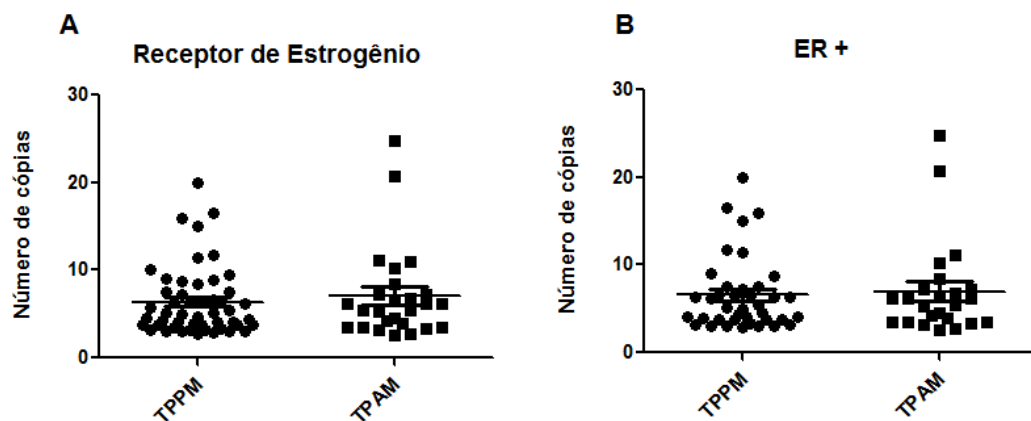


FIGURA 15 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O GANHO DO NC DO GENE *CCND1* ENTRE PACIENTES TPPM E TPAM DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ER. **A**: total de pacientes, **B**: positivo para ER.

Legenda: TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar; TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar; ER – receptor de estrogênio. Fonte: O autor, 2014.

5.4 ONCOGENE *HER2*

Das 38 pacientes TPPM, 18 apresentaram o oncogene *HER2* amplificado e 20 não apresentaram. Nestas, as médias do NC foram, respectivamente, iguais a $6,68 \pm 4,40$ e $7,04 \pm 4,23$. Das 22 pacientes TPAM, 11 foram positivas e 11 negativas,

com médias de NC, respectivamente, iguais a $8,29 \pm 35,34$ e $4,71 \pm 2,81$. A diferença entre as médias para a análise total e presença ou ausência de HER2 das pacientes TPPM e TPAM não foi estatisticamente significativa ($t=0,32$; $P>0,70$; $t=0,82$; $P>0,4$; $t= 1,74$; $P= 0,09$, respectivamente para a análise total de pacientes, HER2 positivo e HER2 negativo) (FIGURA 16).

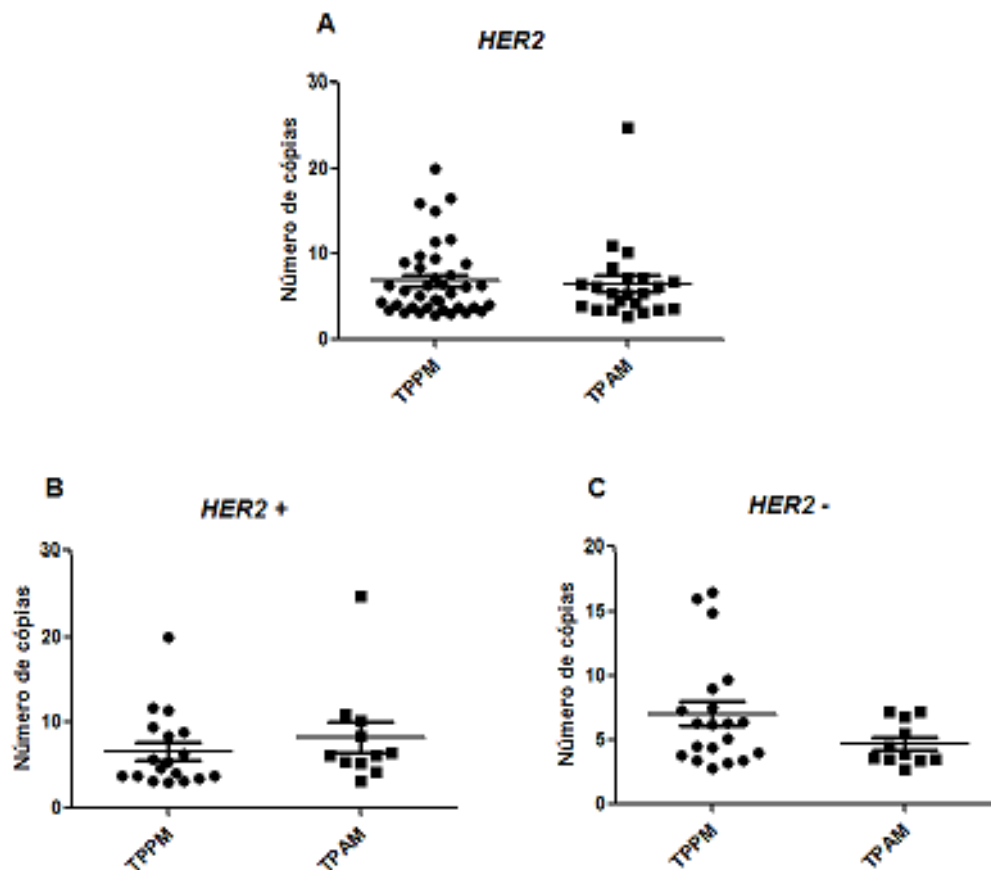


FIGURA 16 - GRÁFICOS DE DISPERSÃO PARA O GANHO DO NC DO GENE *CCND1* ENTRE PACIENTES TPPM E TPAM de acordo com a positividade ou não da superexpressão de HER2. **A:** total de pacientes, **B:** HER2 positivo, **C:** HER2 negativo.

Legenda: TPPM – pacientes com presença de metástase em linfonodo axilar; TPAM – pacientes com ausência de metástase em linfonodo axilar. Fonte: O autor, 2014.

6 DISCUSSÃO

O gene *CCND1* se apresenta amplificado em cerca de 15-20% dos casos de câncer de mama e sua proteína é superexpressa em aproximadamente 50% dos casos (GILLETT *et al.*, 1994). Portanto, tendo o indicativo por meio da literatura de que a Ciclina D1 participa do processo de tumorigênese, o presente estudo foi realizado para determinar se havia diferença entre o número de cópias desse gene em dois grupos de carcinomas ductais mamários: com e sem metástases em linfonodos axilares, visando avaliar a influência do número de cópias no processo metastático. Além disso, tivemos a oportunidade de comparar estes resultados com dados de expressão gênica e imunohistoquímica obtidos em trabalho anteriormente realizado no nosso grupo de pesquisa (MAIA, 2014).

Os dados obtidos nesse trabalho corroboram os apresentados na literatura para este gene, uma vez que todas as amostras (102) apresentaram ganho do número de cópias. Entretanto, não apresentaram diferença estatisticamente significativa de ganho de NC entre os grupos amostrais, TPPM e TPAM. Do mesmo modo, Bièche e colaboradores (2002) ao analisar a expressão e amplificação da Ciclina D1 em 134 pacientes com tumores primários de mama, pelos métodos RT-qPCR com ensaios *TaqMan* e *Southern blot*, não encontraram diferença significativa entre pacientes com e sem metástase em linfonodo axilar. Ao avaliar o tempo de sobrevida e recidiva, observaram que pacientes com mau resultado apresentavam amplificação do gene *CCND1* juntamente com a superexpressão de sua proteína. A amplificação da região 11q13, onde se localiza *CCND1*, conduz a uma maior expressão da Ciclina D1 resultando na proliferação mais rápida dos tumores mamários epiteliais e, assim, gerando um pior prognóstico.

A Ciclina D1 apresenta uma função independente de CDK em que é capaz de interagir e ativar o receptor de estrogênio. Zwijsen e colaboradores (1997) observaram a ligação física direta de Ciclina D1 com o domínio de ligação ao receptor de estrogênio, o que resulta em aumento da transcrição do receptor de estrogênio. A ativação do receptor de estrogênio pela *CCND1* é independente da formação do complexo com CDK, mas exige o recrutamento de p300/CAF e o receptor coativador-1 de esteroide (SRC-1), e não é inibida pelos fatores anti-estrogênios. Diante disso depara-se com uma maior frequência de amplificação e

superexpressão de *CCND1* nos tumores que apresentam expressão do ER (HUI *et al.*, 1997; 1998; BIÈCHE *et al.*, 2002). No presente estudo não foi observada essa relação do ganho de número de cópias de *CCND1* com a expressão do receptor de estrogênio. No entanto vários outros estudos têm demonstrado essa associação (HUI *et al.*, 1998; BOSTNER *et al.*, 2007; ELSHEIKH *et al.*, 2008; TABARESTANI *et al.*, 2014). Tais resultados sugerem que a amplificação deste oncogene pode desempenhar um papel na iniciação e/ou na progressão de câncer de mama, principalmente naqueles ER+.

Alguns estudos demonstram efeitos adversos ao tratamento com Tamoxifeno de pacientes ER+ que apresentam a amplificação de *CCND1*. No entanto, apesar da amplificação do gene as pacientes apresentaram níveis normais de expressão da proteína Ciclina D1 não estabelecendo correlação direta entre a amplificação e quantidade do produto proteico. Este fato sugere que um ou mais genes podem ser co-amplificados com o *CCND1* podendo então afetar o resultado das pacientes tratadas com o Tamoxifeno (JIRSTROM *et al.*, 2005; HOLM *et al.*, 2012). Burandt e colaboradores (2007) e Ludgren e colaboradores (2012) analisaram a amplificação e expressão de Ciclina D1 em pacientes na pós-menopausa tratadas com Tamoxifeno. A amplificação do gene *CCND1*, nestas pacientes, apresentou-se apenas relacionada com a expressão de ER dentre os parâmetros clínicos histopatológicos analisados. Além disso, associaram a amplificação de *CCND1* ao risco aumentado de recorrência do câncer de mama enquanto que a alta expressão da Ciclina D1 foi associada com a diminuição da taxa de recorrência da doença. Ao avaliar os benefícios desse tratamento estes não foram encontrados em pacientes com amplificação de *CCND1* demonstrando uma tendência para a diminuição da sensibilidade ao Tamoxifeno indicando uma resistência a esse tratamento. Estes resultados preveem um mau resultado clínico em pacientes com câncer de mama na pós-menopausa tratadas com Tamoxifeno e estão relacionados com a agressividade do tumor e o aumento da recorrência da doença em pacientes ER+ com 50 anos ou mais. Outros estudos demonstram que há uma associação entre a amplificação de *CCND1* e a superexpressão de sua proteína nos tumores que apresentam expressão dos dois receptores hormonais, ER e PR. Tal resultado ampara a ideia de que a alta expressão de ER pode cooperar com a conservação dos níveis de *CCND1* no citoplasma (GAO & ZELENKA, 1997; STENDAHL *et al.*, 2004; ELSHEIKH *et al.*, 2008).

A região 11q13 abrange quase 14 Mb e contém mais de 200 genes que podem ser afetados por vários padrões de ganhos no número de cópias, o que sugere mecanismos complexos e pressão seletiva durante a progressão do tumor. Algumas co-amplificações como *HER2-TOP2A*, *MYC-CCND1* e *MYC-HER2* parecem ter associação com o aumento do grau tumoral, sugerindo que estes eventos possam conferir uma vantagem seletiva para as células tumorais e contribuir para taxas de sobrevivência reduzidas. Além disso, podem servir como indicadores da instabilidade genômica dos tumores facilitando a ocorrência de outras alterações genéticas e assim contribuindo para a progressão tumoral (CUNY *et al.*, 2000; AL-KURAYA *et al.*, 2004; TABARESTANI *et al.*, 2014). Um gene desta região que pode ser amplificado e relacionado com mau resultado clínico no câncer de mama é o oncogene *EMS1* que está localizado a 800kb do gene *CCND1* e codifica uma proteína que se liga ao citoesqueleto. A superexpressão da Ciclina D1 observada neste tipo de tumor sem a amplificação de seu gene pode ser devida a um efeito de dosagem de genes simples onde a amplificação de outros genes, como o *EMS1*, contribui para os altos níveis de *CCND1*. Portanto, a amplificação da região 11q13 pode simplesmente refletir uma instabilidade genômica em tumores de mama (BIÈCHE *et al.*, 2002).

Holm e colaboradores (2012) estudaram tumores mamários com e sem a amplificação do gene *CCND1* avaliando a sobrevida global de acordo com os graus histológicos e dos subtipos moleculares. A amplificação deste gene foi associada a uma menor sobrevida para o grau histológico II e para o subtipo luminal A sugerindo a sua associação com um fenótipo de câncer de mama mais agressivo dentro destes parâmetros.

Tabarestani e colaboradores (2014) avaliaram as correlações entre CNAs e características clínicas e histopatológicas e encontraram associação significativa da amplificação de 10 genes, entre eles o *CCND1*, com o aumento do grau histológico e com o aumento do tamanho do tumor indicando que a amplificação deste e outros genes como *MYC*, *HER2* e *TOP2A*, podem estar associados com o fenótipo tumoral mais agressivo como já relatado em outros estudos (ROSS & FLETCHER, 1998; DEMING, *et al.*, 2000; BIÈCHE *et al.*, 2002; TURNER *et al.*, 2010, DUFFY *et al.*, 2011; BURANDT *et al.*, 2014). Em contrapartida, no presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre o ganho do número de cópias do gene *CCND1* com os graus tumorais, nem para ER, PR e HER2 indicando que, neste

grupo amostral, este gene não está relacionado com os parâmetros prognósticos usuais. Tabarestani e colaboradores (2014) não encontraram diferença significativa, assim como no presente estudo, em relação a idade das pacientes no momento do diagnóstico, presença ou ausência de metástase em linfonodos, amplificação ou não de *HER2*, porém encontraram significância para a ausência de PR (PR-), sugerindo que a amplificação de *CCND1* pode ser útil como um marcador para a resposta a hormônio em tumores PR-.

Burandt e colaboradores (2014) verificaram que não havia diferença no nível de amplificação de *CCND1* em oito diferentes áreas tumorais analisadas em amostras de carcinomas mamários, demonstrando uma homogeneidade de comportamento e sugerindo que a amplificação deste gene é um evento precoce no desenvolvimento do câncer de mama. Nossos resultados também apontam para a precocidade deste evento, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros que indicam progressão do tumor.

O ganho do número de cópias dos genes *CCND1*, *TRAF4*, *CDC6* e *MTDH* foi observado em 40% dos casos de câncer de mama masculino e associados com o alto grau do tumor, sendo que o *CCND1* se mostrou como um preditor de sobrevida (KORNEGOOR *et al.*, 2012). Este estudo também mostrou que o ganho do número de cópias de *CCND1* parece ser mais frequente no câncer de mama masculino em comparação com o câncer de mama feminino. Diversos genes relacionados ao câncer de mama do sexo feminino também parecem ser importantes no processo de carcinogênese do tipo masculino. No entanto, existem diferenças entre o número de cópias desses genes entre os sexos, indicando algumas diferenças na carcinogênese entre esses tipos de câncer de mama de tal modo que é importante identificar biomarcadores e agentes terapêuticos que tenham como base pesquisas no câncer de mama masculino.

Diversos autores indicam que a relação entre a amplificação do gene e a superexpressão proteica não é necessariamente direta. Vários trabalhos têm descrito que em torno de 15-20% dos tumores de mama exibem amplificações de *CCND1*, enquanto que a superexpressão da sua proteína tem aparecido entre 30 a 50% dos tumores primários de mama (GILLETT *et al.*, 1996; BARBARESCHI *et al.*, 1997; JARES *et al.*, 1997; NIELSEN *et al.*, 1997; KENNY *et al.*, 1999; BIÈCHE *et al.*, 2002). Tais resultados evidenciam que a superexpressão de *CCND1* nem sempre deve ser atribuída às alterações gênicas como as amplificações. Diversas análises

de mRNA e DNA para o gene *CCND1* tem mostrado que no câncer de mama as pacientes que apresentavam uma boa evolução possuíam tumores com superexpressão de *CCND1* sem a amplificação de seu gene, enquanto que pacientes que expressavam um pior prognóstico também apresentavam a amplificação do *CCND1* (ALI *et al.*, 1989; HENRY *et al.*, 1993; BIÈCHE *et al.*, 2002). Esta relação pode ser consequência de outros mecanismos como a regulação pós-transcricional (por meio microRNAs) e mecanismos que atuam após a tradução (perturbação da exportação nuclear, degradação de *CCND1* que provocam seu acúmulo no citoplasma) (KIM & DIEHL, 2009). Por outro lado, há autores que defendem a relação direta entre a amplificação gênica e superexpressão de Ciclina D1 (REIS-FILHO *et al.*, 2006; ELSHEIKH *et al.*, 2008).

Em trabalho realizado anteriormente no LabCHO, analisou-se a expressão gênica (RT-qPCR) e tecidual (imunohistoquímica) de *CCND1* tendo como grupos amostrais pacientes com presença e ausência de metástases em linfonodo axilar (MAIA, 2014). Tal estudo encontrou a superexpressão do gene e da proteína *CCND1*. No entanto, assim como neste estudo, não obteve diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros clínicos e histopatológicos. Apesar de termos analisado amostras diferentes, ambas procuraram correlacionar com a presença e ausência de metástases em linfonodos, utilizando este dado como parâmetro de progressão. O fato de termos identificado aumento do número de cópias nos permite sugerir que há uma relação entre o ganho do número de cópias de *CCND1* e o aumento da expressão do gene e de sua proteína.

7 CONCLUSÃO

O ganho do número de cópias do gene *CCND1* em amostras de carcinomas primários de mama com presença e ausência de metástases em linfonodos axilares foi condizente com o que é descrito na literatura uma vez que se mostrou aumentado em todas as amostras utilizadas. Este estudo não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados para nenhum dos parâmetros clínicos e histopatológicos analisados, sendo eles: idade no momento do diagnóstico, grau tumoral, presença ou ausência dos receptores hormonais ER e PR, expressão aumentada de HER2. Portanto, neste grupo amostral, o *CCND1* não parece estar relacionado com o processo de metastatização, logo não desempenharia função expressiva neste momento da progressão do câncer de mama, corroborando com os autores que sugerem que este seja um evento precoce na evolução tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agendia® Decoding Cancer. Disponível em <<http://www.agendia.com/>>. Acessado em agosto 2014.

ALBANESE, C.; JOHNSON, J.; WATANABE, G.; EKLUND, N.; VU, D.; ARNOLD, A.; PESTELL, R.G. **Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions.** J Biol Chem. v.270(40). 23589–23597. 1995.

ALI, I.U.; MERLO, G.; CALLAHAN, R.; LIDEREAU, R. **The amplification unit on chromosome 11q13 in aggressive primary human breast tumors entails the bcl-1, int-2 and hst loci.** Oncogene. v.4, p.89-92. 1989.

AL-KURAYA, K.; SCHRAML, P.; TORHORST, J.; TAPIA, C.; ZAHARIEVA, B.; NOVOTNY, H.; SPICHTIN, H.; MAURER, R.; MIRLACHER, M.; KÖCHLI, O.; ZUBER, M.; DIETERICH, H.; MROSS, F.; WILBER, K.; SIMON, R.; SAUTER, G. **Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer.** Cancer Res. v.64, p.8534–8540. 2004.

AMERICAN CÂNCER SOCIETY. 2008. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_is_breast_cancer_5.asp>. Acessado em junho de 2014.

AMANATULLAH, D.F.; ZAFONTE, B.T.; ALBANESE, C.; FU, M.; MESSIERS, C.; HASSELL, J.; PESTELL, R.G. *et al.* **Ras regulation of cyclin D1 promoter.** Methods Enzymol, v.333, p.116-127, 2001.

ANTONIOU, A.; PHAROAH, P.D.; NAROD, S.; RISCH, H.A.; EYFJORD, J.E.; HOPPER, J.L.; LOMAN, N.; OLSSON, H.; JOHANNSSON, O.; BORG, A.; PASINI, B.; RADICE, P.; MANOUKIAN, S.; ECCLES, D.M.; TANG, N.; OLAH, E.; ANTON-CULVER, H.; WARNER, E.; LUBINSKI, J.; GRONWALD, J.; GORSKI B.; TULINIUS, H.; THORLACIUS, S.; EEROLA, H.; NEVANLINNA, H.; SYRJÄKOSKI, K.; KALLIONIEMI, O.P.; THOMPSON, D.; EVANS, C.; PETO, J.; LALLOO, F.; EVANS, D.G.; EASTON, D.F. **Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies.** Am J Hum Genet. v.72(5), p.1117-30.2003.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Protocol TaqMan® Copy Number Assays.** 2010

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. **The genetics and genomics of cancer.** Nature Genetics Supplement. v.33, p. 238-244. 2003

BANI-HANI, K.; MARTIN, I.G.; HARDIE, L.J.; MAPSTONE, N.; BRIGGS, J.A.; FORMAN, D.; WILD, C.P. **Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma.** J Natl Cancer Inst. v.92, p.1316-1321, 2000.

BANNISTER, A.J.; KOUZARIDES T. **The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.** Nature. v.384(6610), p.641–643.1996.

BARBARESCHI, M.; PELOSIO, P.; CAFFO, O.; BUTTITTA, F.; PELLEGRINI, S.; BARBAZZA, R.; DALLA PALMA, P.; BEVILACQUA, G.; MARCHETTI, A. **Cyclin-D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathological characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21WAF1 immunohistochemical expression.** Int J Cancer (Pred Oncol). v.74, p.171-174, 1997.

BARTKOVA, J.; LUKAS, J.; MÜLLER, H.; LÜTZHØFT, D.; STRAUSS, M.; BARTEK, J. **Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer.** Int J Cancer. v.57, p.353-361, 1994.

BERTUCCI F.; BIRNBAUM D.; GONÇALVES A. **Proteomics of breast carcinoma: principles and potential clinical applications.** Mol Cell Proteomics. 2006.

BIÈCHE, I., OLIVI, M., NOGUES, C., VIDAUD, M.; LIDEREAU, R. **Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays.** Br. J. Cancer. V.86, p.580–586. 2002.

BIRNBAUM, D.; BERTUCCI, F.; GINESTIER, C.; TAGETT, R.; JACQUEMIER, J.; CHARAFE-JAUFFRET, E. **Basal and luminal breast cancers: basic or luminous?** Int J Oncol. 2004.

BOSTNER, J.; WALTERSSON, M.A.; FORNANDER, T.; SKOOG, L.; NORDENSKJOLD, B.; STAL, O. **Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer.** Oncogene. v.26, p.6997-7005, 2007.

BURANDT, E.; GRÜNERT, M.; LEBEAU, A.; CHOSCHZICK, M.; QUAAS, A.; JÄNICKE, F.; MÜLLER, V.; SCHOLZ, U.; BOKEMEYER, C.; PETERSEN, C.; GEIST, S.; PALUCHOWSKI, P.; WILKE, C.; HEILENKÖTTER, U.; SIMON, R.; SAUTER, G.; WILCZAK, W. **Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer**. Breast Cancer. 2014.

CARVALHO, C. M. S. **Análise da expressão gênica de tropomiosinas em carcinomas mamários**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2013.

CASIMIRO, M.C.; VELASCO-VELÁZQUEZ, M.; AGUIRRE-ALVARADO, C.; PESTELL, R.G. **Overview os cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape**. Informa Healthcare. v.23 (3), p.295-304, 2014.

CHENG, M.; SEXL, V.; SHERR, C.J.; ROUSSEL, M.F. **Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1)**. Proc Natl Acad Sci U S A. v.95(3), p.1091–1096. 1998.

COCO MARTIN, J.M; BALKENENDE, A.; VERSCHOOR, T.; LALLEMAND, F.; MICHALIDES, R. **Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line**. Cancer Res. v.59(5), p.1134–40. 1999.

COOPER, G. M. M.; ZERR, T.; KIDD, J.M.; EICHLER, E.E.; NICKERSON, D.A. **Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide snp genotyping**. Nature genetics. v. 40, p. 1199-1203, 2008.

CUNY, M.; KRAMAR, A.; COURJAL, F.; JOHANNSDOTTIR, V.; IACOPETTA, B.; FONTAINE, H.; GRENIER, J.; CULINE, S.; THEILLET, C. **Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations**. Cancer Res. v.60,p.1077–1083. 2000.

DEMING, S. L.; NASS, S.J.; DICKSON, R.B.; TROCK, B.J. **C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance**. Br. J. Cancer. v.83, p.1688–1695. 2000.

DIEHL, J.A. **Cycling to cancer with cyclin D1**. *Cancer Biol Ther.* v.1, p.226-231, 2002.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. **Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models**. *Breast Cancer Research*, v. 7(4), p.171-179, 2005.

DENOIX, P.F. *Bull. Inst. Nat. Hyg.* v. 7, p. 743, 1952.

DONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, Q.; TOWNSEND, C.M.JR.; EVERS, B.M. **DNA methylation contributes to expression of the human neurotensin/neuromedin N gene**. *Am J Physiol* v.274, p. G535–G543. 1998.

DUFFY, M. J.; MULLOOLY, M.; O'DONOVAN, N.; SUKOR, S.; CROWN, J.; PIERCE, A.; MCGOWAN, P.M. **The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?** *Clin. Proteomics*. 2011.

DVORKIN-GHEVA, A; HASSELL, J. A. **Identification of a novel luminal molecular subtype of breast cancer**. *Plos One*, v.9(7). 2014.

ELSHEIKH, S.; GREEN, A.R.; ALESKANDARANY, M.A.; GRAINGE, M.; PAISH, C.E.; LAMBROS, M.B.; REIS-FILHO, J.S.; ELLIS, I.O. **CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome**. *Breast Cancer Res Treat*,v.109(2), p.325-335, 2008.

FEUK, L.; CARSON, A. R.; SCHERER, S. W. **Structural variation in the human genome**. *Nature Rev. Genet.* v.7, p.85–97. 2006.

FU, M.; WANG, C.; LI, Z.; SAKAMAKI, T.; PESTELL, R.G. **Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions**. *Endocrinology*. v.145 (12), p.5439-5447, 2004.

GALVÃO, E.R.C.G.N.; MARTINS, L.M.S.; IBIAPINA, J.O.; ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.H. **Breast cancer proteomics: a review for clinicians**. *J Cancer. Res Clin Oncol*, v.137, p.915-925, 2011.

GAO, C.Y.; ZELENKA, O.S. **Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation.** *BioEssays.* v.19(4), p.307-315, 1997.

Genetics Home Reference: Your Guide to Understanding Genetic Conditions. Disponível em <<http://ghr.nlm.nih.gov/BrowseGenes>>. Acessado em setembro de 2014.

GILLETT, C.E.; FANTL, V.; SMITH, R.; FISHER, C.; BARTEK, J.; DICKSON, C.; BARNES, D.; PETERS, G. **Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining.** *Cancer Res.* v.54 (7), p. 1812–1817. 1994.

GILLETT, C.; SMITH, P.; GREGORY, W.; RICHARDS, M.; MILLIS, R.; PETERS, G.; BARNES, D. **Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer.** *Int J Cancer (Pred Oncol).* v.69, p.92-99, 1996.

GUIMARÃES, J.R. **Manual de oncologia.** 3ª ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica. 2008.

GULLO L. *et al.* **Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged time study 717.** *Gastroenterol Clin Biol.* v.22, p.25–28. 1998.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. **The hallmarks of cancer.** *Cell,* v.100, p.57-70, 2000.

HENRY, J.A.; HENNESSY, C.; LEVETT, D.L.; LENNARD, T.W.; WESTLEY, B.R.; MAY, F.E. **Int-2 amplification in breast cancer: association with decreased survival and relationship to amplification of c-erbB-2 and c-myc.** *Int J Cancer,* v.53, p.774-780, 1993.

HOLM, K.; STAAF, J.; JÖNSSON, G.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; GUNNARSSON, H.; ARASON, A.; MAGNUSSON, L.; BARKARDOTTIR, R.B.; HEGARDT, C.; RINGNÉR, M.; BORG, A. **Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 inCCND1-amplified sporadic and familial breast tumours.** *Breast Cancer Res Treat.* v.133, p.583–594. 2012.

HUI, R.; CAMPBELL, D.H.; LEE, C.S.; MCCAUL, K.; HORSFALL, D.J.; MUSGROVE, E.A.; DALY, R.J.; SESHADRI, R.; SUTHERLAND, R.L. **EMS1 amplification can occur independently of CCND1 or INT-2 amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer.** *Oncogene*. v.15(13), p.1617–1623. 1997.

HUI, R.; BALL, J.R.; MACMILLAN, R.D.; KENNY, F.S.; PRALL, O.W.; CAMPBELL, D.H.; CORNISH, A.L.; MCCLELLAND, R.A.; DALY, R.J.; FORBES, J.F.; BLAMEY, R.W.; MUSGROVE, E.A.; ROBERTSON, J.F.; NICHOLSON, R.I.; SUTHERLAND, R.L. **EMS1 gene expression in primary breast cancer: relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival.** *Oncogene*. v.17(8), p.1053–1059. 1998.

IAFRATE, A. J.; FEUK, L.; RIVERA, M. N.; LISTEWNIK, M. L.; DONAHOE, P. K.; QI, Y.; SCHERER, S. W.; LEE, C. **Detection of large-scale variation in the human genome.** *Nature Genetics*. v.36(9), p.949-951 2004.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2012.** Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2012. Acessado em Setembro de 2014.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2014.** Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2014. Acessado em Setembro de 2014.

International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>> Acessado em setembro de 2014

JARES, P.; REY, M.J.; FERNANDEZ, P.L.; CAMPO, E.; NADAL, A.; MUNOZ, M.; MALLOFRE, C.; MUNTANE, J.; NAYACH, I.L.; ESTAPE, J.; CARDESA, A. **Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status.** *J Pathol*, v.182, p.160-166, 1997.

JIRSTROM, K.; STENDAHL, M.; RYDÉN, L.; KRONBLAD, A.; BENDAHL, P.O.; STÅL, O.; LANDBERG, G. **Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification.** *Cancer Res*. v.65(17), p.8009–8016. 2005.

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*. v. 24, p. 2137-2150, 2006.

KENNY, F.S.; HUI, R.; MUSGROVE, E.A.; GEE, J.M.W.; BLAMEY, R.W.; NICHOLSON, R.I.; SUTHERLAND, R.L.; ROBERTSON, J.F.R. **Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer.** *Clin Cancer Res*. v.5(8), p.2069–2076. 1999.

KERR J. F.; WINTERFORD C. M.; HARMON B. V. **Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.** *Cancer*. v.73, p.2013–2026.1994.

KIM, J.K.; DIEHL, J.A. **Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer.** *J. Cell. Physiol*. v.220(2), p.292-296, 2009.

KING M. C.; MARKS J. H.; MANDELL J. B. **Breast Cancer Study G. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2.** *Science*. v.302(5645), p.643-6436. 2003.

KOORNEGOOR, R.; MOELANS, C.B.; VERSCHUUR-MAES, A.H.; HOGENES, M.C.; DE BRUIN, P.C.; OUDEJANS, J.J.; MARCHIONNI, L.; VAN DIEST, P.J. **Oncogene amplification in male breast cancer: analysis by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Breast Cancer Res Treat*. v.135, p.49–58. 2012.

KORSMEYER S. J. **BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death,** *Cancer Res*. v.59, p.1693s–1700s.1999.

KOZICZAK M.; HYNES N. E. **Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and ErbB2 in regulation of cyclin D1 translation.** *J Biol Chem*. v.279(48), p.50004–50011.2004.

LU, F.; GLADDEN, A.B.; DIEHL, J.A. **An Alternatively Spliced Cyclin D1 Isoform, Cyclin D1b, Is a Nuclear Oncogene.** *Cancer Res*. v.63, p.7056-7061, 2003.

LUNDGREN, K.; BROWN, M.; PINEDA, S.; CUZICK, J.; SALTER, J.; ZABAGLO, L.; HOWELL, A.; DOWSETT, M.; LANDBERG, G.; TRANSATAC INVESTIGATORS. **Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study.** *Breast Cancer Res.* v.14(2), 2012.

MAIA, L. B. L. **Análise da expressão gênica e protéica de CCND1 em carcinomas primários de mama.** 130p. Dissertação (Mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2014.

MASSAGUÉ, J. **G1 cell-cycle control and cancer.** *Nature.* v.432(18), p.298-306. 2004.

MASSOM, A. L. TALSETH-PALMER, B.A.; EVANS, T.J.; GRICE, D.M.; HANNAN, G.N.; SCOTT, R. J. **Expanding the genetic basis of copy number variation in familial breast cancer.** *Hereditary Cancer in Clinical Practice.* v.12, 1-10. 2014.

MCCMAHON, C.; SUTHIPHONGCHAI, T.; DIRENZO, J.; EWEN, M.E. **P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor.** *Proc Natl Acad Sci.* v.96(10), p.5382–5387. 1999.

MOTOKURA, T.; ARNOLD, A. **PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene: genomic organization, 5' DNA sequence, and sequence of a tumor-specific rearrangement breakpoint.** *Genes Chromosomes Cancer.* v.7, p.89-95, 1993.

MUSGROVE E. A.; LEE, C.S.; BUCKLEY, M.F.; SUTHERLAND, R.L. **Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is suficiente for cells arrested in G1 to complete the cell cycle.** *Proc Natl Acad Sci.* v.91(17), p.8022–8026. 1994.

NAROD S. A.; FOULKES W. D. **BRCA1 and BRCA2: and beyond.** *Nature Reviews Cancer.* v.4(9), p.665-76. 2004.

NIELSEN, N.H.; EMDIN, S.O.; CAJANDER, J.; LANDBERG, G. **Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein.** *Oncogene.* v.14, p.295-304, 1997.

NOLA, S.; SIN, S.; BONIN, F.; LIDEREAU, R.; DRIOUCH, K.A. **Methodological approach to unravel organ-specific breast cancer metastasis.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* v.17, p.135-145, 2012.

NOWEL, P. C. The clonal evolution of tumor cells population. *Science*. v.194, p.23-28.1976.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**. 6 ed. W.B. Saunders Company. 2001.

OLDENBURG, R. A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. **Genetic susceptibility for breast cancer : How many more genes to be found ?** *Oncology Hematology*. p.125-149. 2007.

OLIVEIRA, S. F. V. **Análise de perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 9 (9p) em pacientes com carcinomas primários de mama**. 147p. Dissertação (Mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.2009.

OMIM. Disponível em < <http://omim.org/entry/162651>>. Acessado em julho de 2014.

Oncotype DX® Breast Cancer Assay. Disponível em <<http://breast-cancer.oncotypedx.com/en-US>>. Acessado em agosto de 2014.

OREL, S.G.; MENDONCA, M.H.; REYNOLDS, C.; SCHNALL, M.D.; SOLIN, L.J.; SULLIVAN, D.C. **MR imaging of ductal carcinoma in situ**. *Radiology*. v.202, p. 413-420, 1997.

PARKER, J.S.; MULLINS, M.; CHEANG, M.C.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENBUSH, J.F.; STIJLEMAN, I.J.; PALAZZO, J.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T.O.; ELLIS, M.J.; PEROU, C.M.; BERNARD, P.S. **Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes**. *Journal of Clinical Oncology*. v. 27(8), p.1160-1167. 2009.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; *et al.* **Molecular portraits of human breast tumours**. *Nature*. v. 406(6797), p. 747 –752, ago. 2000.

PESTELL, R.G. **New roles of Cyclin D1**. *The American Journal of Pathology*. v.183(1), 2013.

POLYAK, K. **Breast Cancer: origins and evolution.** The Journal of Clinical Investigation. v.117(11), p.3155-3163. 2007

PRAT, A.; PARKER, J.S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J.I.; HE, X.; PEROU, C.M. **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** Breast Cancer Research. v.12, 2010.

PUSZTAI, L.; AYERS, M.; STEC, J.; *et al.* **Gene expression profiles obtained from single passage fine needle aspirations (FNA) of breast cancer reliably identify prognostic/predictive markers such as estrogen (ER) and HER-2 receptor status and reveal large scale molecular differences between ER-negative and ER-positive tumors.** Clin Cancer Res. v. 9, p.2406 – 2415, 2003.

QUELLE, D.E.; ASHMUN, R.A.; SHURTLEFF, S.E.; KATO, J.Y.; BAR-SAGI, D., ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J. **Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts.** Genes Dev. v.7(8), p.1559–71. 1993.

REINECKE M. **Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone.** Prog Histochem Cytochem. v.16, p.1–172. 1985.

REIS-FILHO, J.; PUSZTAI, L. **Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction.** The lancet. v.378. 2011.

REIS-FILHO, J.S.; SAVAGE, K.; LAMBROS, M.B.K.; JAMES, M.; STEELE, D.; JONES, R.L.; DOWSETT, M. **Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis.** Modern Pathology. v.19, p.999-1009, 2006.

REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH, K.R.; FEUK, L.; PERRY, G.H.; ANDREWS, T.D.; FIEGLER, H.; SHAPERO, M.H.; CARSON, A.R.; CHEN, W.; CHO, E.K.; DALLAIRE, S.; *ET AL.* **Global variation in copy number in the human genome.** Nature. v.444(23). 2006.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. **The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy.** *Oncologist.* v.3, p.237–252. 1998.

ROSTENE W. H.; ALEXANDER M. J. **Neurotensin and neuroendocrine regulation.** *Front Neuroendocrinol.* v.18, p.115–173. 1997.

ROY, P. G.; THOMPSON, A. M. **Cyclin D1 and Breast Cancer.** *The Breast.* v.15, p.718 – 727. 2006

SESHADRI R.; LAKSHMI, B.; TROGE, J.; ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LUNDIN, P.; MÂNÉR, S.; MASSA, H.; WALKER, M.; CHI, M.; NAVIN, N.; LUCITO, R.; HEALY, J.; HICKS, J.; YE, K.; REINER, A.; GILLIAM, T.C.; TRASK, B.; PATTERSON, N.; ZETTERBERG, A.; WIGLER, M. **Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis.** *Clin Cancer Res.* v.2(7), p.1177–84. 1996.

SHERR C. J.; ROBERTS J. M. **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev.* v.13(12), p.1501–1512. 1999.

SMALLEY, M.; ASHWORTH, A. **Stem cells and breast cancer: a field in transit.** *Nature Reviews.* v.3, p. 832-844. 2003.

SOMAI, S.; GOMPEL, A.; ROSTÈNE, W.; FORGEZ, P. **Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* v.295, p.482–488. 2002.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN LONNING, P.; BORRESEN-DALE, A.L. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA.* v.98, p.10869-10874, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C.M.; LONNING, P.E.; BROWN, P.O.; BORRESEN -DALE, A.L.; BOTSTEIN, D. **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. v.100, p.8418-8423, 2003.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.Y.; MCSHANE, L.M.; *et al.* **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** Proc Natl Acad Sci. v.100, p.10393 – 10398, 2003.

SOUAZE, F.; DUPOUY, S.; VIARDOT-FOUCAULT, V.; BRUYNEEL, E.; ATTOUB, S.; GESPACH, C.; GOMPEL, A.; FORGEZ, P. **Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression.** Cancer Res. v.66, p.6243–6249. 2006.

STACEY, D. W. **Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells.** Curr Opin Cell Biol. v.15, p.158-163, 2003.

STENDAHL, M.; KRONBLAD, A.; RYDEN, L.; EMDIN, S.; BENGTSSON, N.O.; LANDBERG, G. **Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients.** Br J Cancer. v.90(10), p.1942-1948, 2004.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. **From polyploidy and aneuploidy, genome instability and cancer.** Nature Review of the Molecular Cell Biology. v.5, p.45-54, 2004.

TABARESTANI, S.; GHADERIAN, S.M.; REZVANI, H.; MIRFAKHRAIE, R.; EBRAHIMI, A.; ATTARIAN, H.; RAFAT, J.; GHADYANI, M.; ALAVI, H.A.; KAMALIAN, N.; RAKHSHA, A.; AZARGASHB, E. **Prognostic and predictive value of copy number alterations in invasive breast cancer as determined by multiplex ligation-dependent probe amplification.** Cell Oncol. v.37, p.107–118. 2014.

THOMPSON D.; EASTON D. **Breast Cancer Linkage C. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers.** Am J Hum Genet. v.68(2), p.410-419. 2001.

THULER, L. C. S.; MENDONÇA, G. A. **Estadiamento inicial dos casos de cancer de mama e colo de útero em mulheres brasileiras.** Rev Bras Ginecol Obstet. v.27(11), p.656-660. 2005.

TNM: Estadiamento dos tumores de mama. SPCC - Hospital São Marcos Clínica de Ginecologia e Mastologia UICC – União Internacional Contra o Câncer - TNM 6ª edição

TURNER, N.; PEARSON, A.; SHARPE, R.; LAMBROS, M.; GEYER, F.; LOPEZ-GARCIA, M.A.; NATRAJAN, R.; MARCHIO, C.; IORNS, E.; MACKAY, A.; GILLETT, C.; GRIGORIADIS, A.; TUTT, A.; REIS-FILHO, J.S.; ASHWORTH, A. **FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer.** Cancer Res. v.70, p.2085–2094. 2010.

VALENTIN, M.D; DA SILVA, S.D.; PRIVAT, M.; ALAOUI-JAMALI, M.; BIGNON, Y. **Molecular insights on basal-like breast cancer.** Breast cancer research treatment. v.134, p.21-30, 2012.

VOSE, J.M. **Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, riskstratification, and clinical management.** Am J Hematol. v.88(12), p.1082-1088. 2013.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. **Modelling breast cancer: one size does not fit all.** Nature Reviews Cancer. v. 7, p. 659 – 672. 2007.

VIEIRA, D. S. C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. **Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação.** Revista Brasileira de Ginecol Obstet. 2008.

WANG L.; FRIESS H.; ZHU Z. **Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease.** Clin Cancer Res. v.6, p.566–571. 2000.

WANG, C.; LI, Z.; FU, M.; BOURAS, T.; PESTELL, R.G. **Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential.** Cancer Treat Res. v.119, p.217-237, 2004.

WANG Q.; ZHOU Y.; EVERS B. M. **Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells.** Neoplasia. v.8, p.781–787. 2006.

WEBER, J.D.; RABEN, D.M.; PHILLIPS, P.J.; BALDASSARE, J.J. **Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase.** *Biochem J.* v.326, p.61–68. 1997.

WEINBERG, R.A. **A biologia do Câncer.** PORTO ALEGRE: ARTMED, 2008.

WEIR, B.; ZHAO, X.; MEYERSON, M. **Somatic alterations in the human cancer genome.** *Cancer Cell.* Vol. 6. p. 433-438. 2004

WIESTNER, A.; TEHRANI, M.; CHIORAZZI, M.; WRIGHT, G.; et al. **Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter Survival.** *American Society of Hematology,* v.109, p.4599-4606, 2007.

ZWIJSEN, R.M.; WIENTJENS, E.; KLOMPMAKER, R.; VAN DER SMAN J.; BERNARDS, R.; MICHALIDES, R.J. **CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1.***Cell.* v.88, p.405 – 415. 1997.

ZWIJSEN, R. M.; Buckle, R.S.; Hijmans, E.M.; Loomans, C.J.M.; Bernards, R. **Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1.** *Genes Dev.* v.12(22), p.3488–98. 1998.