

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEPHANIE BATH DE MORAIS

ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* EM  
CARCINOMAS MAMÁRIOS

CURITIBA

2014

STEPHANIE BATH DE MORAIS

ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* EM  
CARCINOMAS MAMÁRIOS

Monografia apresentada à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (Bmed006) como requisito parcial à conclusão do curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Enilze Maria de Souza  
Fonseca Ribeiro

CURITIBA

2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelo sustento durante todos esses anos. Pela graça e misericórdia renovadas em mim todos os dias. Sem Ele eu não seria capaz de coisa alguma.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro pela orientação e oportunidade de desenvolver meu trabalho junto a ela. Foi uma grande alegria e honra participar de sua linha de pesquisa durante este ano.

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli pela dedicação e paciência em me ensinar.

Aos membros da banca por aceitarem me avaliar e pelas contribuições ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética pela amizade, pelos momentos de descontração e pelas várias ajudas durante este ano.

Às pacientes que estiveram envolvidas neste estudo, sem elas esta pesquisa não seria possível.

À Dr<sup>a</sup> Tatiana A. C. B. de Souza, minha supervisora do estágio obrigatório no Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, pela amizade e pelos ensinamentos. Agradeço por tantas vezes ter sido compreensiva nos momentos em que precisei me dedicar um pouco mais ao TCC.

A meus colegas do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas por aquilo que me ensinaram e ajudaram durante esse ano.

A meus pais, Claudimir e Karin, pelo cuidado e amor. Por me ensinarem a enfrentar todas as dificuldades, por serem meu exemplo de vida. Obrigada pela compreensão e proteção. Obrigada por tantas vezes me ajudarem com minhas necessidades. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, sei que posso sempre confiar em vocês. É uma honra ser sua filha, amo vocês!

A meu irmão Abner que esteve sempre ao meu lado para me incentivar e fazer rir. Pela alegria em ter um irmão tão companheiro, protetor e querido. Obrigada por sempre me fazer sentir capaz.

Ao Lucas pelo amor, carinho e incentivo. Mesmo estando distante sempre me fez sentir amada e muitas vezes me ajudou em minhas dúvidas e dificuldades. Obrigada por sempre se orgulhar de mim e por compreender quando eu precisava estudar. Quero contigo crescer e aprender, eu te amo!

Às amigas do curso de Biomedicina com quem tive a oportunidade de estar durante todos estes anos. Com quem aprendi e me diverti. Agradeço pelo companheirismo e pela paciência comigo.

Aos amigos que me são como irmãos. Agradeço pela amizade, pelo amor, pela preocupação e por toda a compreensão durante todos estes anos de estudo.

## RESUMO

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer em mulheres de todo o mundo. A incidência dessa doença maligna vem aumentando a cada ano, de forma que depois do câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente na população feminina brasileira e mundial. A análise de genes envolvidos no início e na progressão tumoral é uma das estratégias que pode ser adotada para auxiliar a compreensão da doença e a orientação de pesquisas para o desenvolvimento terapêutico. O gene do receptor de neurotensina do tipo 1 (*NTSR1*) tem sido descrito como contribuinte da progressão tumoral do câncer de mama. A sua expressão aumentada é considerada um marcador prognóstico desfavorável em diversos tumores, incluindo carcinomas mamários e o ganho do número de cópias gênicas, na maioria dos casos, associa-se ao aumento da expressão gênica. O objetivo deste trabalho foi analisar a alteração do número de cópias do gene *NTSR1* em 78 amostras de carcinomas mamários primários e associá-la à diferenciação e progressão dos subtipos deste câncer presentes na nossa amostra. Essa análise foi realizada por meio de ensaios de PCR quantitativa em tempo real em grupos de amostras tumorais dos subtipos nomeados luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplo negativo. Os subtipos moleculares apresentam diferentes fatores de risco, aspectos clínicos e patológicos e respostas aos tratamentos, evidenciando a importância de marcadores que auxiliem na subclassificação dos tumores de mama. Verificamos que a alteração do número de cópias do gene *NTSR1* depende do subtipo do câncer de mama e foi maior nos subtipos de maior agressividade (triplo negativo e HER2 positivo). Além disso, foi verificada uma associação entre os maiores números de cópias do gene e as amostras de maior grau histológico. O gene *NTSR1* e suas alterações do número de cópias podem ser um importante marcador para os subtipos mais agressivos do câncer de mama, além de ser um potencial alvo terapêutico para estes subtipos, que, no caso do triplo negativo, não possui uma estratégia de tratamento específica.

Palavras-chave: Câncer de mama. Gene *NTSR1*. Classificação imunohistoquímica. Alteração do número de cópias. Marcadores.

## ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women worldwide. The incidence of this malignant disease has been increasing every year, in a way that, breast cancer is the most frequent cancer in the Brazilian and worldwide women, after non-melanoma skin cancer. The analysis of genes involved in the emergence and progression of tumors is one of the strategies that may be adopted to support the understanding of the disease and the guidance of researches for therapeutic development. The neurotensin receptor type 1 gene (*NTSR1*) has been described as contributor to breast cancer's tumor progression. Its overexpression is considered a negative prognostic marker in various tumors, including breast carcinomas and the copy number gain of *NTSR1* gene, in most cases, is associated with increased gene expression. The objective of this study was to analyze the copy number alterations of the *NTSR1* gene in 78 samples of primary breast carcinomas and relate it to the differentiation and progression in the detected immunohistochemistry subtypes in our sample. This analysis was carried out by real time quantitative PCR assay in tumors sample groups denominated as luminal A, luminal B, HER2 positive and triple negative subtypes. The molecular subtypes present different risk factors, clinical and pathological aspects and responses to treatments, highlighting the importance of markers which aid in the sub-classification of breast tumors. It was found that the copy number alterations of the *NTSR1* gene depends on the breast cancer subtype and was higher in more aggressive subtypes (triple negative and HER2 positive). Furthermore, it was observed an association between increase copy numbers of the gene and the samples with higher histological grade. The *NTSR1* gene and its copy number alterations may be an important marker for more aggressive breast cancer subtypes, as well as being a potential therapeutic target for these subtypes, which in the triple negative's case, does not have a specific treatment strategy.

Keywords: Breast cancer. *NTSR1* gene. Immunohistochemistry classification. Copy number alterations. Markers.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	9
2.1 CÂNCER DE MAMA.....	9
2.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA.....	12
2.3 FATORES GENÉTICOS.....	16
2.4 ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS.....	17
2.5 GENE <i>NTSR1</i> E PROTEÍNA NTSR1.....	17
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	25
4.1 OBJETIVO GERAL.....	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	26
5.1 AMOSTRAS.....	26
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	30
5.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	31
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>6 RESULTADOS</b> .....	33
6.1 SUBTIPOS MOLECULARES.....	33
6.2 IDADE.....	37
6.3 METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES.....	38
6.4 GRAU HISTOLÓGICO.....	39
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer abrange mais de 100 doenças que têm em comum a proliferação celular desordenada e constitui um problema de saúde pública mundial. Em 2012 foram registrados 14,1 milhões de novos casos mundiais e 8,2 milhões de mortes por câncer. As perspectivas para o futuro revelam um quadro ainda mais preocupante, é esperada a ocorrência de 21,4 milhões de novos casos no nível global e 13,2 milhões de mortes por câncer para o ano de 2030. A prevenção, o diagnóstico e o controle do câncer precisam receber uma significativa atenção, pois o crescente número de novos casos poderá esgotar os recursos suficientes para seu tratamento e acompanhamento (INCA, 2014).

O Brasil não apresenta um quadro diferente do mundial. Para este ano de 2014 as estimativas apontaram para o surgimento de 576 mil novos casos de câncer. Desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente e a principal causa de morte por câncer na população brasileira feminina (INCA, 2014).

Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar alterações genéticas que possam ser utilizadas como marcadores capazes de facilitar o diagnóstico precoce e a compreensão das diversas vias de sinalização intracelular que contribuem para a iniciação e a progressão do câncer de mama. Além disso, os marcadores ideais são aqueles que possibilitam a realização de testes pouco invasivos, possuem alta eficiência e sensibilidade e auxiliam na criação de propostas de novas abordagens terapêuticas mais específicas para cada caso identificado.

Marcadores como a superexpressão da proteína HER2 e presença dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) representam importantes ferramentas de classificação do câncer de mama e de seleção da melhor terapia disponível (RAKHA *et al.*, 2010). A subdivisão do câncer de mama através da análise de expressão gênica (classificação molecular) foi primeiramente descrita por Perou e colaboradores (2000) e Sorlie e colaboradores (2001, 2003). Em uma versão atualizada da classificação original, podem ser identificados quatro subtipos moleculares do câncer de mama descritos em ordem crescente de agressividade tumoral: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo e Basal (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).



O gene do receptor de neurotensina do tipo 1 apresenta-se como um potencial marcador para o câncer de mama. Assim como outros receptores de peptídeos que promovem o crescimento celular, o receptor da neurotensina tem sido descrito com expressão aumentada em alguns tumores atuando em proliferação celular, sobrevivência, invasão, angiogênese e metástase (SOUAZÉ *et al.*, 2006). No câncer de mama a expressão aumentada deste receptor é um marcador prognóstico desfavorável, sendo um provável marcador da progressão tumoral nos diferentes subtipos moleculares (DUPOUY *et al.*, 2014).

Considerando a importância da classificação molecular e o potencial papel desempenhado pelo receptor de neurotensina do tipo 1 no câncer de mama, o objetivo deste trabalho foi avaliar a alteração do número de cópias (CNA, do inglês: *Copy Number Alterations*) do gene *NTSR1* em amostras de quatro subtipos de carcinoma mamário.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado e é a principal causa de morte por câncer em mulheres de todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. É responsável por 23% dos novos casos totais de câncer e por 14% do total de mortes por câncer (JEMAL *et al.*, 2011). De acordo com o INCA (2014), a estimativa de novos casos para o Brasil é de 57.120 para o biênio de 2014/2015, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil habitantes. Em países da América do Norte e da Europa as taxas de mortalidade do câncer de mama têm diminuído, devido à detecção precoce e aos melhores tratamentos (JEMAL *et al.*, 2011). Entretanto no Brasil as taxas de mortalidade por câncer de mama ainda são altas, provavelmente porque o diagnóstico ocorre em estágios mais avançados da progressão tumoral (INCA, 2014). O diagnóstico precoce do câncer permite que o tratamento seja iniciado quando o câncer ainda não se espalhou e, desta forma, é possível observar uma redução das taxas de mortalidade (IARC, 2002; LITAKER; TOMOLO, 2007; VOGT *et al.*, 2014).

O sintoma mais comum e palpável é a formação de nódulos de consistência dura e irregular nas mamas, acompanhada ou não de dor. Além disso, podem aparecer nódulos palpáveis na axila, secreção no mamilo, alterações na pele da mama, como abaulamento ou retração e aspecto das mamas semelhante à casca de uma laranja. As formas atuais mais frequentes de diagnóstico do câncer de mama são o exame clínico e a mamografia. O exame clínico das mamas é realizado por um médico ou por enfermeiros treinados na busca por nódulos superficiais e deve ocorrer a cada um ano em mulheres a partir de 40 anos. A mamografia consiste na radiografia da mama que permite a visualização de lesões ainda iniciais, devendo ser realizada uma vez a cada dois anos em mulheres entre 50 e 69 anos ou de acordo com a recomendação médica (INCA, 2014).

O carcinoma mamário não possui uma causa única, mas resulta de um conjunto de fatores que podem contribuir para o desenvolvimento tumoral. Entre eles estão os fatores endócrinos relacionados à exposição ao estrógeno, como menarca precoce (antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (após os 50 anos), uso de

contraceptivos orais e da terapia hormonal pós-menopausa. Constituem-se ainda como parte dos fatores de risco a nuliparidade, a primeira gravidez tardia (após os 30 anos), a idade avançada, a raça (mulheres brancas são aquelas que apresentam maior suscetibilidade ao câncer de mama), o excesso de peso, o consumo exagerado de álcool e a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos (NEWCOMB; WERNLI, 2010; JEMAL *et al.*, 2011; SCHNEBLE *et al.*, 2014; INCA, 2014).

A predisposição genética também se apresenta como um fator de risco para o câncer de mama. Embora represente menos de 10% dos casos, o histórico familiar positivo é bem consolidado como sendo um fator de risco para este câncer. Mulheres com casos de um parente de primeiro grau diagnosticado com câncer de mama apresentam um aumento de aproximadamente duas vezes no risco para o câncer de mama. Este risco aumenta de acordo com o número de parentes afetados (DUMALAON-CANARIA *et al.*, 2014).

O sistema mais utilizado para a classificação dos tumores malignos é o sistema TNM, que categoriza o câncer dependendo da extensão do tumor primário (T), da ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástases à distância (M). A cada uma destas categorias é adicionado um número para indicar a extensão da doença maligna (QUADRO 1). Esta classificação é disponibilizada pelo INCA (2014) e está de acordo com os padrões da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC).

<b>T- Tumor primário</b>	<b>N - Linfonodos regionais</b>	<b>M – Metástase à distância</b>
TX - O tumor primário não pode ser avaliado	NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados	M0 - Ausência de metástase à distância
T0 - Não há evidência de tumor primário	N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais	M1 - Metástase à distância
Tis - Carcinoma <i>in situ</i>	N1-N3 - Comprometimento crescente dos linfonodos regionais	
T1-T4 - Tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário		

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DE TUMORES MALIGNOS DE ACORDO COM O SISTEMA TNM

FONTE: O autor (2014), <http://www.cancer.org.br/tnm>

Os carcinomas mamários podem também ser classificados de acordo com o seu grau histológico. O sistema *Nottingham Grandin*, modificação do sistema *Scarff-Bloom-Richardson*, é o mais recomendado para a realização da graduação histológica. O grau histológico oferece um panorama das características biológicas e dos comportamentos clínicos. Baseia-se no grau de diferenciação do tecido tumoral e indica o potencial de malignidade dos tumores invasivos.

- Grau I (baixo): bem diferenciado e com melhor prognóstico.
- Grau II (intermediário): moderadamente diferenciado.
- Grau III (alto): pouco diferenciado e com pior prognóstico.

O alto grau histológico, além de ser relacionado a um pior prognóstico, também é descrito com maior probabilidade de recorrência mais precoce e de morte (RAKHA *et al.*, 2010).

A maior parte dos casos de câncer de mama acomete as células epiteliais que revestem os ductos e os lóbulos mamários, sendo denominados de carcinomas ductais e carcinomas lobulares, respectivamente. Há ainda outros subtipos histológicos, como os mucinosos, os medulares, os tubulares e os papilares, mas que correspondem a uma parcela muito menor dos casos (GUIMARÃES, 2008). O primeiro estágio da neoplasia mamária é o carcinoma *in situ* (CIS), as células apresentam atipia e possuem um significativo aumento das taxas mitóticas e das alterações genéticas. O estágio mais avançado desta neoplasia é o carcinoma invasor (CI), que é caracterizado pelo rompimento da membrana basal pelas células epiteliais, resultando na invasão do estroma circundante (TLSTY *et al.*, 2004).

Muitos aspectos contribuem para a grande importância clínica do câncer de mama, entre eles está a alta taxa de recorrência da doença. Mesmo após o tratamento curativo é necessário um acompanhamento das pacientes por toda a sua vida, visto que cerca de 15% destas mulheres irão desenvolver uma segunda neoplasia maligna dentro de dez anos. Estas recorrências ocorrem principalmente na forma de metástases que atingem um órgão distinto do local original. No câncer de mama, as metástases podem ser encontradas nos linfonodos regionais (linfonodos axilares, infraclaviculares, mamários internos e supraclaviculares) e em órgãos distantes. Conforme mostra a FIGURA 1 as metástases em locais distantes para o câncer de mama estão preferencialmente localizadas no pulmão, no fígado e nos ossos. A heterogeneidade das metástases dificulta a definição de cura e dos

fatores de risco do carcinoma mamário (UICC, 2004; WEIGELT *et al.*, 2005; SCHNEBLE *et al.*, 2014).

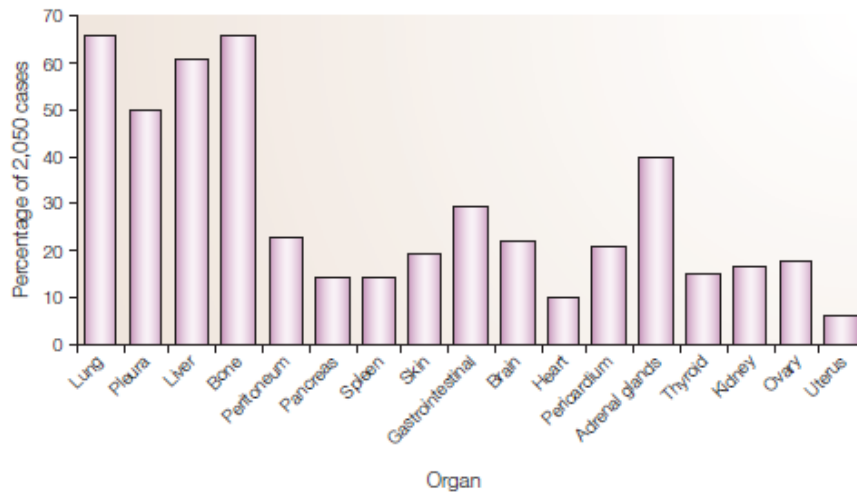


FIGURA 1 - METÁSTASES MAIS COMUNS DO CÂNCER DE MAMA  
 FONTE: WEIGELT *et al.* (2005)

## 2.2 Classificação Molecular do Câncer de Mama

A classificação molecular do carcinoma mamário é esquematizada tomando como base a expressão gênica dos diversos fenótipos tumorais. Descrita inicialmente por Perou e colaboradores (2000), foi demonstrado que os carcinomas mamários podem ser classificados em quatro grupos de acordo com o perfil de expressão gênica: luminal, basal, *normal-like* e HER2 positivo. Estudos posteriores realizados por Sorlie e colaboradores (2001, 2003) subdividiram o grupo luminal em luminal A e B. Algumas das diferenças entre os subtipos são relacionadas ao *status* dos receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR) e à amplificação do oncogene *ERBB2* (também denominado *HER2*). Em alguns casos também têm sido medida a expressão da proteína Ki-67 (marcador de proliferação celular) e de marcadores basais como citoqueratinas de alto peso molecular, porém, a sua utilização ainda não está completamente estabelecida (RAKHA, E. A *et al.*, 2010).

**Luminal A:** Este grupo apresenta um perfil de expressão semelhante ao das células luminais do epitélio mamário normal e representa 50-60% dos carcinomas mamários. Em geral apresenta alta expressão de ER e expressa genes regulados pelo estrogênio. Além disso, os carcinomas enquadrados neste subtipo expressam PR, não possuem amplificação do gene *HER2* e têm baixa expressão de genes

relacionados à proliferação celular, como o gene da proteína Ki-67. Sua ocorrência está associada a tumores de menor grau histológico, com o melhor prognóstico e alta taxa de sobrevida (2,2 anos). Estes pacientes não possuem uma boa resposta à quimioterapia, por isso o mais utilizado para eles é a terapia adjuvante com o tamoxifeno (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012; EROLES *et al.*, 2012).

**Luminal B:** Tumores com o perfil molecular do tipo luminal B representam 10 a 20% dos casos de câncer de mama. Assim como o grupo luminal A, eles expressam ER e PR, porém possuem um fenótipo mais agressivo: prognóstico inferior, maior grau histológico e menor taxa de sobrevida (1,6 anos). Além disso, o grupo luminal B é definido como ER+/PR+/HER2+ ou ER+/PR+/HER2- e alto Ki-67. Portanto, outra diferença encontra-se na amplificação do gene *HER2* ou na expressão de genes proliferativos. A terapia é realizada de forma satisfatória com quimioterápicos (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012; EROLES *et al.*, 2012).

**HER2 positivo:** A principal característica deste grupo é a alta expressão do gene *HER2*. Mas também é encontrada uma alta expressão de genes relacionados à proliferação celular, altos valores de Ki-67 e negatividade para os receptores hormonais. A terapia é realizada através da combinação da quimioterapia com drogas anti-HER2. Os tumores mamários deste tipo correspondem entre 15 e 20% do total e são clinicamente caracterizados por possuírem um prognóstico desfavorável e alto grau histológico. Outra característica observada neste grupo é a presença de mutações no gene *TP53* em mais de 40% das pacientes (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012; EROLES *et al.*, 2012).

**Normal-like:** Apresentam perfil de expressão semelhante às células do parênquima mamário normal e aos fibroadenomas. São ER+/PR+/HER2- com alta expressão de Ki-67. Seu prognóstico clínico é considerado intermediário e com baixo grau histológico. Representando a minoria dos carcinomas mamários (5-10%) são pouco caracterizados e existem dúvidas sobre a sua real existência, algumas pesquisas sustentam a hipótese de que este grupo seja uma contaminação com tecido normal durante os ensaios (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011; EROLES *et al.*, 2012).

**Basal:** Dentre os cinco grupos propostos por Perou *et al.* (2000) e Sorlie *et al.* (2001, 2003) o grupo basal é considerado o mais agressivo, com o maior grau histológico, prognóstico desfavorável e surgimento em idade precoce (antes dos 50 anos). Possui um fenótipo normalmente ER-/PR-/HER2- e alto Ki-67. A expressão é semelhante ao das células basais mioepiteliais mamárias, composta de uma ou mais citoqueratinas de alto peso molecular (CK 5/6, CK 14, CK 17), vimentina e EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal). Tem sido encontrada uma forte relação do subtipo basal e mutações no gene *BRCA1* e cerca de 85% das pacientes deste subtipo são portadoras de mutações no gene *TP53*. Sua frequência é de 10-20% e o tratamento mais indicado é a quimioterapia (TURNER; REIS-FILHO, 2006; BADVE *et al.*, 2011; GOLDBIRSCH *et al.*, 2011; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012; EROLES *et al.*, 2012).

Com o objetivo de reduzir a heterogeneidade existente dentro dos subtipos já definidos, nos últimos anos têm sido propostos novos subtipos moleculares com base em suas características específicas, como claudina baixa (do inglês, *claudin low*) e apócrino molecular (do inglês, *molecular apocrine*).

**Claudina baixa:** Identificado em 2007 por Herschkowitz e colaboradores, este subtipo se particulariza pela baixa expressão das claudinas 3, 4 e 7 e da e-caderina e alta expressão de marcadores de Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial-to-mesenchymal transition*). Essa expressão gênica faz com que as células tumorais deste subtipo apresentem características similares a células tronco iniciadoras de tumor. Seu perfil molecular é descrito como ER-/PR-/HER2-. Abrange aproximadamente 13% dos carcinomas mamários e possui um prognóstico considerado intermediário e alto grau histológico (PRAT *et al.*, 2010; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012).

**Apócrino molecular:** Os tumores deste tipo são definidos como ER-/PR- e HER2 positivo ou negativo. O prognóstico é desfavorável e o grau histológico é alto. A característica peculiar deste subtipo encontra-se na alta expressão do receptor de androgênio (AR) (FARMER *et al.*, 2005; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012).

Os subtipos moleculares do câncer de mama apresentam diferentes fatores de risco, diferentes aspectos clínicos e patológicos e diferentes respostas às terapias empregadas. Desta forma, a classificação molecular pode auxiliar na determinação da melhor abordagem terapêutica específica para cada indivíduo, e

não simplesmente para a média das pacientes (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; EROLES *et al.*, 2012). As principais diferenças entre os subtipos encontram-se resumidas na TABELA 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

Subtipo Molecular	Marcadores imunohistoquímicos	Ki-67	Marcadores basais	Grau histológico	Prognóstico	Frequência
Luminal A	ER+ PR+ HER2-	Baixo	-	I ou II	Bom	50-60%
Luminal B	ER+ PR+ HER2+ ER+ PR+ HER2-	Baixo Alto	-	II ou III	Intermediário/ Desfavorável	10-20%
HER2 positivo	ER- PR- HER2+	Alto	+	II ou III	Desfavorável	15-20%
Basal	ER- PR- HER2-	Alto	-/+	III	Desfavorável	10-20%
<i>Normal-like</i>	ER+ PR+ HER2-	Alto	-/+	I	Intermediário	5-10%
Claudina baixa	ER- PR- HER2-	Médio	-/+	III	Intermediário	12-14%
Apócrino Molecular	ER- PR- HER2+/-	Alta	-/+	II ou III	Desfavorável	-

FONTE: GOLDHIRSCH *et al.* (2011); REIS-FILHO & PUSZTAI (2011); ALIZART *et al.* (2012); EROLES *et al.* (2012).

Existe ainda um grupo heterogêneo definido como tumores triplo negativos (TNBC) que são caracterizados pela ausência de expressão dos receptores ER, PR e de amplificação do gene *HER2*, daí o termo “triplo negativos”. Eles não se encaixam na classificação molecular atual, porém representam 10-17% de todos os tipos de câncer de mama. Apesar de apresentarem-se semelhantes em nível de transcrição aos tumores do grupo basal, não existe uma sobreposição completa entre eles. No estudo desenvolvido por Bertucci e colaboradores (2008) apenas 71% dos TNBC se encaixaram no subtipo basal e apenas 77% dos tumores basais foram triplo negativos. Os TNBC possuem um histórico clínico ainda mais agressivo. Estão associados a uma maior incidência de metástases viscerais e cerebrais do que ósseas, uma baixa taxa de sobrevida, uma alta taxa de recidiva local e idade precoce de início da doença. Devido a rotas alternativas de metastatização, a maioria das mortes neste subtipo ocorre nos cinco primeiros anos de tratamento e existe uma maior probabilidade de recorrência entre o primeiro e o terceiro ano. Por falta de tratamento específico é aplicado o tratamento convencional com quimioterápicos, mas isso deixa margens para o aparecimento da recidiva local (CLEATOR *et al.*, 2007; BADVE *et al.*, 2011).



### 2.3 Fatores Genéticos

O câncer de mama, bem como outros carcinomas, resulta de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que transformam células normais em células tumorais. As alterações genéticas acontecem devido a instabilidades no genoma e podem ser perda de genes, ampliações gênicas, mutações de ponto e translocações cromossômicas. A maioria destas alterações leva à morte celular, mas o envolvimento de alguns genes chaves, como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor, pode culminar na formação de um tumor (OSBORNE *et al.*, 2004).

Os proto-oncogenes são responsáveis por codificar proteínas que recebem e processam sinais estimuladores do crescimento celular que surgem no meio extracelular e têm a sua expressão regulada de acordo com as necessidades da célula. Quando estes genes sofrem alguma mutação, são transformados nos chamados oncogenes, promovendo uma proliferação celular desregulada característica de tumores (WEINBERG, 2008). Os oncogenes mais frequentemente encontrados no carcinoma mamário são *ERBB2*, *MYC*, *CCND1* e *PI3KCA* (LEE; MULLER, 2010).

Genes supressores de tumor realizam a manutenção da integridade do genoma e o controle da proliferação celular através de proteínas regulatórias, as quais impedem a progressão do ciclo celular quando são encontrados danos ao DNA a fim de repará-los. Dois eventos de mutação em um destes genes podem desequilibrar o funcionamento normal da célula, levando-a a uma proliferação desordenada sem que ocorra a checagem e o reparo dos danos ao genoma (OSBORNE *et al.*, 2004; WEINBERG, 2008).

Os genes supressores de tumor mais frequentemente envolvidos com o câncer de mama podem ser divididos em dois grupos: de “alto risco” e de “baixo a moderado risco” para o desenvolvimento tumoral. O grupo de “alto risco” é constituído principalmente dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *LKB1/STK11* e *CDH1*; e no segundo grupo estão os genes *CHK2*, *TGFB1*, *CASP8* e *ATM* (OLDENBURG *et al.*, 2007). Estes genes compreendem apenas 25% dos tumores de mama de causa hereditária, pode-se então inferir que devem existir outros genes ainda não identificados envolvidos na susceptibilidade ao câncer de mama (BRADBURY & OLOPADE, 2007).

## 2.4 Alteração do número de cópias de DNA

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 ao DNA genômico constitucional do mesmo indivíduo (BEROUKHIM *et al.*, 2010). 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 têm revelado muitas dessas alterações no genoma humano desempenhando um importante papel na etiologia de doenças complexas (WEIR, ZHAO e MEYERSON, 2004).

As alterações do número de cópias de DNA são comuns em câncer e alteram a expressão e função dos genes localizados na região afetada. A identificação de regiões de cromossomos com alteração no número de cópias e dos genes envolvidos é de extrema importância na compreensão do desenvolvimento tumoral e na busca por novos diagnósticos e alvos terapêuticos (KALLIONIEMI, 2008).

Um ganho em alterações do número de cópias de DNA está ligado a um pior prognóstico em diversos tumores como câncer de ovário (BIRRER *et al.*, 2007), câncer colorretal (KIM *et al.*, 2006), mieloma (CARRASCO *et al.*, 2006), meduloblastoma (MENDRZYK *et al.*, 2005) e câncer de mama (JAIN *et al.*, 2001).

## 2.5 Gene *NTSR1* e proteína *NTRS1*

O gene humano *NTSR1* está localizado no braço longo (20q13.33) do cromossomo 20 (FIGURA 2) e é expresso principalmente no cérebro e no trato gastrointestinal (TGI). O gene possui mais de 10 kb e contém 4 éxons e 3 íntrons (FIGURA 3), sendo que todos os três íntrons estão localizados na região codificante (LE *et al.*, 1997; VINCENT *et al.*, 1999). Na caracterização do gene realizada por Le e colaboradores (1997) foram identificados polimorfismos de repetição tetranucleotídea com pelo menos 23 alelos que têm sido relacionados a distúrbios neuropsiquiátricos (LI *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2013).

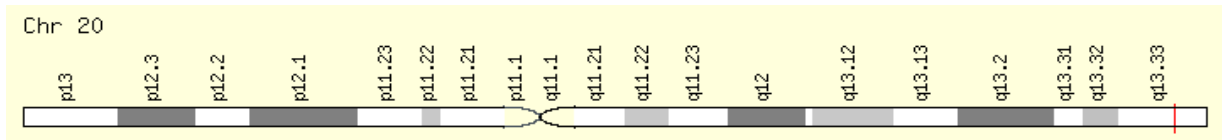


FIGURA 2 - CROMOSSOMO 20

FONTE: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NTSR1>

LEGENDA: **Em vermelho**, localização do gene *NTSR1* no cromossomo 20 (20q13.33).

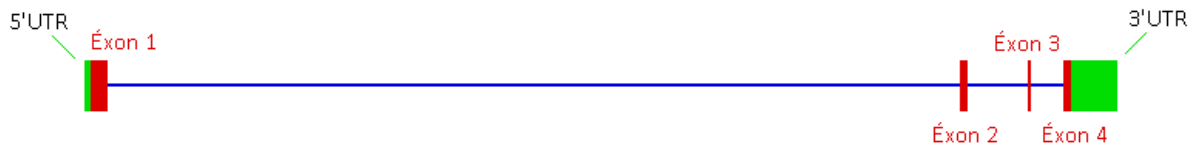


FIGURA 3 - ESTRUTURA DO GENE *NTSR1*

FONTE: <http://refgene.com/gene/4923>, adaptado pelo autor (2014)

O receptor de neurotensina do tipo 1 (NTSR1) (FIGURA 4) é uma proteína de 418 aminoácidos com sete domínios transmembrana que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G (FIGURA 5). Existem ainda outros receptores de neurotensina descritos na literatura. O NTSR1 é o receptor de alta afinidade e o NTSR2 de baixa afinidade, ambos são acoplados à proteína G. O NTSR3 é um receptor não específico codificado pelo gene *SORT1* (VINCENT *et al.*, 1999).

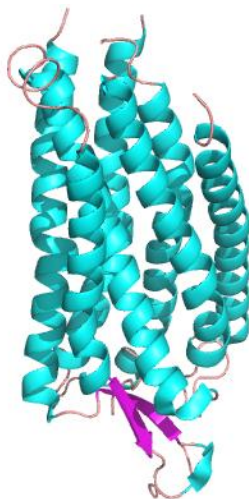


FIGURA 4 - ESTRUTURA DO RECEPTOR DE NEUROTENSINA DO TIPO 1 (NTSR1)

FONTE: O autor (2014), *PyMol Molecular Graphics System*

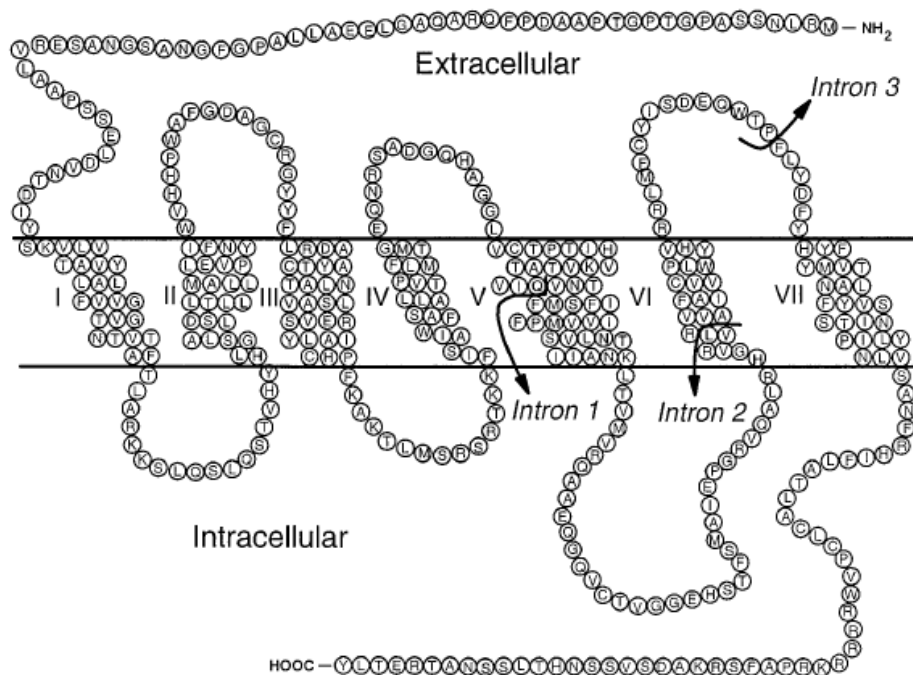


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO NTSR1 COM OS SETE DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA  
 FONTE: LE et al. (1997)  
 LEGENDA: I-VII, domínios transmembrana numerados.

A neurotensina (NTS) é o principal agonista do NTSR1 e foi descoberta em 1973 por Carraway e Leeman. A NTS exerce funções no sistema nervoso e em órgãos periféricos. No cérebro ela atua como um neuromodulador da transmissão da dopamina e da secreção hormonal da glândula pituitária anterior. Na periferia é um modulador parácrino e endócrino no TGI e no sistema cardiovascular. Suas atividades no TGI envolvem motilidade gastrointestinal, estimulação das secreções pancreática e biliar, e age como facilitadora da translocação de ácidos graxos para o lúmen intestinal. Além disso, a NTS é bem retratada por estimular o crescimento celular de diversos tecidos normais e cancerosos (VINCENT *et al.*, 1999; EVERS, 2006).

Devido a este papel no crescimento celular, a NTS e seu receptor NTSR1 têm sido relacionados à progressão de diversas neoplasias como câncer pancreático, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de pulmão, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (*Head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) e câncer de mama (SOUAZÉ *et al.*, 2006; EVERS, 2006; DUPOUY *et al.*, 2011). O NTSR1 possui um papel fundamental na ativação de inúmeros efeitos da NTS relacionados à progressão e ao crescimento tumoral. Dentre estes efeitos podem ser citados a proliferação, a sobrevivência, a propagação metastática, a

proteção contra apoptose, efeitos pró-migratórios e pró-invasivos (SOMAÏ *et al.*, 2002; SOUAZÉ *et al.*, 2006; DUPOUY *et al.*, 2011).

A contribuição da NTS e do seu receptor NTSR1 no crescimento celular de tecidos normais e, principalmente, tecidos tumorais se inicia pela ligação da NTS ao sítio de ligação do NTSR1, que está acoplado à proteína  $G_q$  (FIGURA 6). Este evento leva à substituição de GDP (difosfato de guanósina) por GTP (trifosfato de guanósina) na proteína  $G_q$ . A subunidade  $G_{\alpha_q/11}$ , ligada ao GTP, move-se até a fosfolipase C (PLC) ativando-a. A PLC ativada cliva o fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em inositol-trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  se liga a um receptor específico no retículo endoplasmático abrindo os canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) que serão liberados para o citosol. O  $Ca^{2+}$  juntamente com o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) (COX; NELSON, 2011; DUPOUY *et al.*, 2011).

Existem outras cascatas de sinalização que podem resultar da ligação da NTS com o NTSR1, porém a maioria dos efeitos oncogênicos do NTSR1 dependem da ativação da PKC (DUPOUY *et al.*, 2011).

As duas isoformas mais comuns da PKC ( $\alpha$  e  $\beta_1$ ) inibem o NTSR1 quando são ativadas. Porém, as isoformas  $\delta$  e  $\epsilon$  mantêm o NTSR1 em funcionamento. São através destas duas últimas isoformas que se dão os efeitos oncogênicos (DUPOUY *et al.*, 2011).

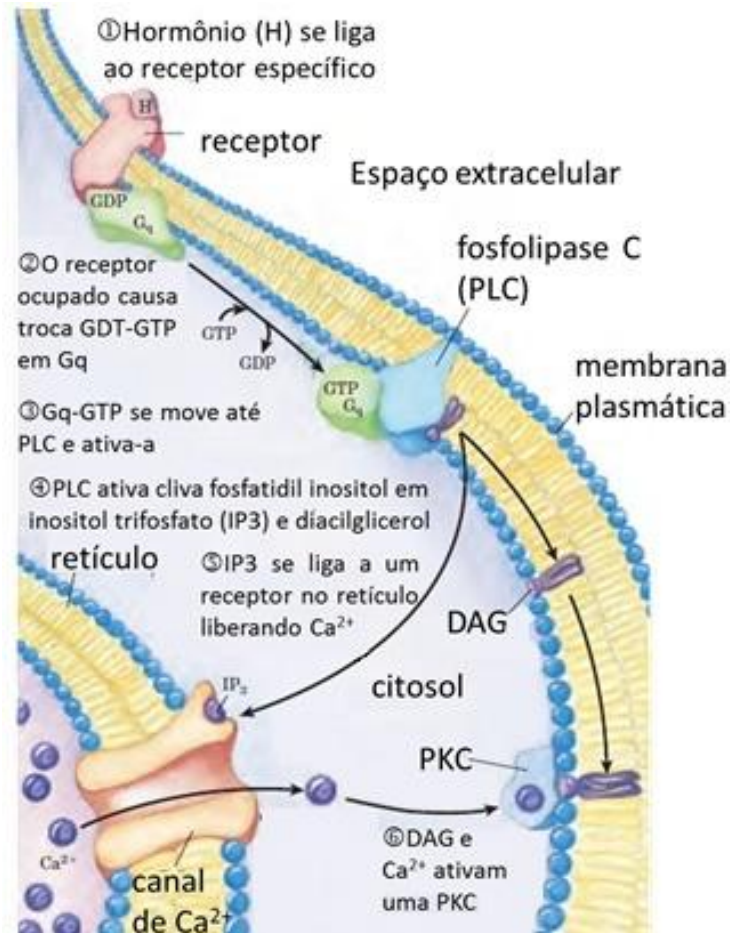


FIGURA 6 - CASCATA DE SINALIZAÇÃO DESENCADEADA PELA LIGAÇÃO DE UM LIGANTE A SEU RECEPTOR LIGADO À PROTEÍNA G

FUNTE: Adaptado de COX; NELSON(2011)

NOTA: No caso estudado, o hormônio (H) corresponde à neurotensina e o receptor específico ao receptor de neurotensina (NTSR1).

A partir da PKC será ativada a cascata das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), principalmente as ERKs (quinases ativadas por fatores de crescimento) (FIGURA 7). ERKs são proteínas relacionadas com a ativação da transcrição de genes da proliferação celular, do bloqueio da apoptose e da diferenciação celular. A PKC ativada pode realizar a ativação das ERKs diretamente pela fosforilação da enzima Raf-1, ou indiretamente pela ativação do proto-oncogene SRC. A Src fosforila a Raf-1, que foi levada até a membrana plasmática pela proteína Ras. A Raf-1 fosforila MEK (quinase regulada por mitógeno), que por sua vez irá fosforilar ERK. Existe ainda outro mecanismo de atuação da PKC, porém ele ainda não é completamente elucidado. Este mecanismo ocorre pela ativação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) por ligantes “EGF-like” que são liberados na membrana plasmática por clivagem proteolítica de enzimas como as MMPs (metaloproteinases de matriz). O EGFR irá ativar fosfatidil-inositol-3-quinase

(PI3K), que irá fosforilar AKT (ou proteína quinase B, PKB). A via MAPK resultará na transcrição de genes como o gene de resposta precoce ao crescimento (*ERG1*), os genes das proteínas Elk-1 do domínio Ets e do fator de transcrição AP-1 (LENZ, 2000; DUPOUY *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012).

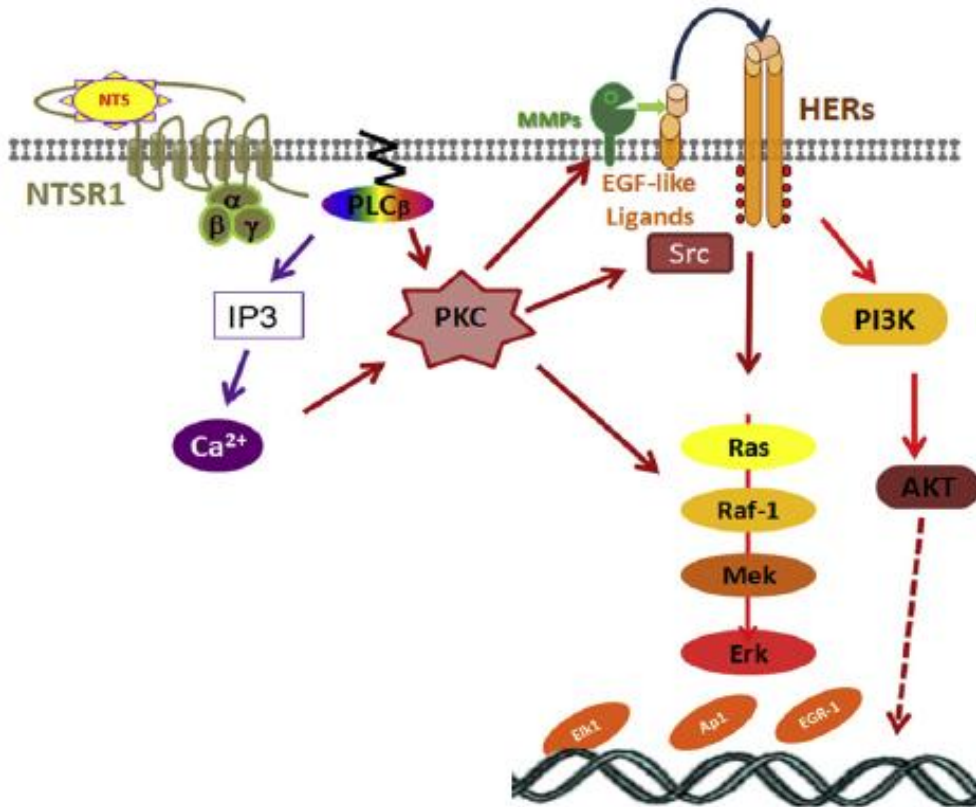


FIGURA 7 - CASCATA DE SINALIZAÇÃO INICIALIZADA PELA LIGAÇÃO NTS-NTSR1  
 FONTE: DUPOUY *et al.* (2011), adaptado pelo autor (2014)

O NTSR1 tem sido relacionado não só à progressão tumoral, mas também à tumorigênese, principalmente em câncer de mama. Isso porque o gene *NTSR1* é um alvo das vias oncogênicas Wnt/APC relacionadas com o complexo de transcrição de h-catenina/Tcf, o qual ativa genes envolvidos na proliferação e transformação celular. Genes *Wnt* possuem uma regulação positiva em câncer de mama e estão associados com a sua tumorigênese (SOUAZÉ *et al.*, 2006).

O uso do NTSR1 como um potencial marcador para a progressão tumoral pode ser justificada no nível transcricional. Em diversos tipos de câncer têm sido observadas altas expressões de NTSR1, como tumor pancreático, HNSCC, carcinoma de pulmão e câncer de mama (DUPOUY *et al.*, 2011). No câncer de mama, a alta expressão de NTSR1 tem sido relacionada a um pior prognóstico em carcinoma mamário ductal (DUPOUY *et al.*, 2009), a tumores mais agressivos com

parâmetros clínicos e histopatológicos desfavoráveis, como tamanho do tumor, grau histológico, número de metástases em linfonodos e mortalidade (DUPOUY *et al.*, 2014). É ainda interessante observar que não é detectada expressão do gene *NTSR1* no epitélio mamário normal (SOUAZÉ *et al.*, 2006), corroborando as evidências da participação do gene *NTSR1* no câncer de mama.



### 3 JUSTIFICATIVA

O número de novos casos mundiais do câncer de mama vem aumentando nas últimas décadas e as estimativas para os próximos anos expõem a possibilidade de uma ampliação na ocorrência de novos casos. A população feminina de países em desenvolvimento é a mais afetada, possuindo as maiores incidências da doença e as maiores taxas de mortalidade por câncer de mama, principalmente devido a ausência de *screening* adequado.

Os diversos subtipos moleculares do câncer de mama (Luminal A, Luminal B, HER2 positivo e Basal) apresentam diferentes características de expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e do oncogene *HER2*. As pacientes classificadas em cada um dos subtipos possuem diferentes quadros clínicos e, portanto, necessitam de terapias específicas. A agregação de novos marcadores que aprimorem a classificação molecular é importante para compreender a iniciação, progressão e/ou melhor abordagem terapêutica para os diferentes subtipos do câncer de mama.

Dentro do contexto da busca por identificar regiões cromossômicas potencialmente portadoras de genes relacionados com a iniciação e progressão tumoral desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, TORRESAN (2011) realizou em estudo genômico que objetivou investigar CNAs do DNA em amostras de tumores de mama primários e metástases em linfonodos axilares. Através da técnica de CGH-array foi verificado que as alterações mais frequentes estavam localizadas em diversas regiões cromossômicas, dentre elas a região 20q13.33, onde foi identificado o gene *NTSR1*.

As CNAs do gene *NTSR1* podem contribuir na diferenciação dos subtipos moleculares do câncer de mama, facilitando a compreensão dos processos de iniciação e progressão tumoral.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Analisar a associação da alteração do número de cópias do gene *NTSR1* com a diferenciação e progressão de quatro subtipos imunohistoquímicos de carcinomas mamários.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as alterações do número de cópias do gene *NTSR1* dos subtipos Luminal A, Luminal B, HER2 positivo e Triplo Negativo de carcinomas primários de mama;
- Correlacionar as alterações do número de cópias do gene *NTSR1* com fatores clínicos e prognósticos como idade da paciente, grau do tumor e presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares;
- Comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Amostras

As amostras de carcinomas mamários são rotineiramente coletadas após o procedimento cirúrgico no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba, Paraná. Para obtenção das amostras, cada uma das pacientes recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido. A coleta foi realizada com aprovação do Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG).

Foram utilizadas neste trabalho 78 amostras de pacientes portadoras de carcinoma mamário primário não tratado, das quais, 74 amostras (95%) foram classificadas como carcinoma ductal invasor. As amostras estão caracterizadas de acordo com o seu quadro clínico e histopatológico no QUADRO 2. Foram tabuladas as informações encontradas relativas à idade, diagnóstico do carcinoma mamário, presença de metástase em linfonodos axilares, grau do tumor, *status* dos receptores de estrogênio e progesterona e amplificação do gene *HER2*.

As amostras foram divididas em quatro grupos baseados em análise imunohistoquímica, de acordo com o *status* dos receptores hormonais (ER e PR) e a amplificação do gene *HER2*. Esta classificação foi baseada na definição clínico-patológica dos subtipos de câncer de mama de Goldhirsch *et al.*, 2011. O QUADRO 3 mostra os parâmetros clínicos e histopatológicos gerais para cada um dos quatro grupos, sendo eles:

- **Triplo Negativo:** ER negativo, PR negativo e HER2 negativo. Devido à falta de dados como a identificação das citoqueratinas CK 5/6, CK 14 e CK 17, não foi possível diferenciar os tumores triplo negativo dos tumores do subtipo basal, por isso todo o grupo foi denominado apenas como triplo negativo.
- **HER2 positivo:** ER negativo, PR negativo e HER2 positivo.
- **Luminal A:** ER positivo, PR, positivo e HER2 negativo. Não foi possível diferenciar o subtipo Luminal B (HER2 negativo) em virtude da falta de informações referentes ao grau expressão da proteína Ki-67. Considerando que a porcentagem dos carcinomas mamários do subtipo Luminal A é maior que do Luminal B, os tumores com este perfil de expressão foram nomeados como Luminal A.

- **Luminal B:** ER positivo, PR positivo e HER2 positivo.

Após a coleta as amostras foram submetidas à remoção do tecido adiposo, do tecido estromal e dos vasos sanguíneos através de tesouras e pinças esterilizadas e de placas de *Petri* descartáveis. O material foi estocado em tubos tipo *ependorfs* a -80°C.

Paciente	Idade	Diagnóstico	L	G	ER	PR	HER2
1	59	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	NEG	NEG	NEG
2	42	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG
3	45	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (>5%)	P	II	NEG	NEG	NEG
4	79	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (>5%)	A	I	POS	POS	POS (3+)
5	69	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Doença de Paget	A	III	NEG	NEG	POS (3+)
6	53	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	III	POS	POS	POS (3+)
7	51	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	A	II	NEG	NEG	NEG (0)
8	63	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (20%)	P	III	NEG	NEG	POS (3+)
9	70	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (9%)	A	I	POS	POS	POS (3+)
10	53	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	POS (3+)
11	72	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS (3+)
12	51	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS (3+)
13	71	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	POS (3+)
14	45	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	NEG (1+)
15	46	Carcinoma Lobular Invasor	A	II	POS	POS	POS (3+)
16	43	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	POS
17	44	Carcinoma Ductal	P	-	NEG	NEG	POS
18	40	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	II	POS	POS	POS

QUADRO 2 CONTINUA - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: O autor (2014)

LEGENDA: **Idade**, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **L**, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; **P**, presença; **A**, ausência; **G**, grau do tumor; **T**, tamanho do tumor em mm; **ER**, status do receptor de estrogênio; **PR**, status do receptor de progesterona; **HER2**, amplificação do oncogene *HER2*; **SOE**, sem outra especificação.

19	72	Carcinoma Ductal Invasor Multicêntrico, associado a Carcinoma Intraductal	A	I	POS	POS	POS
20	55	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
21	54	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
22	63	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS (+2)
23	56	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	II	POS	POS	POS (+3)
24	51	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS (+3)
25	79	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	A	III	NEG	NEG	POS
26	47	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	POS
27	33	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	-	POS	POS	NEG
28	43	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	NEG
29	38	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
30	59	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	NEG	NEG	NEG
31	65	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	NEG
32	54	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	II	POS	POS	POS
33	47	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
34	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG (2+)
35	60	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS (3+)
36	44	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	A	II	POS	POS	POS (3+)
37	82	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS
38	60	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	I	POS	POS	POS(2+)
39	61	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (10%)	P	II	POS	POS	POS(3+)
40	-	Carcinoma Ductal Invasor (core biopsy)	P	-	POS	POS	NEG
41	76	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG
42	44	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS (2+)
43	70	Carcinoma Ductal Invasor multifocal	P	-	POS	POS	POS (2+/3+)
44	58	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a CDIS e comedocarcinoma	P	II	NEG	NEG	POS (1+)
45	66	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	NEG	NEG	NEG

QUADRO 2 CONTINUA - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: O autor (2014)

LEGENDA: **Idade**, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **L**, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; **P**, presença; **A**, ausência; **G**, grau do tumor; **T**, tamanho do tumor em mm; **ER**, status do receptor de estrogênio; **PR**, status do receptor de progesterona; **HER2**, amplificação do oncogene *HER2*; **SOE**, sem outra especificação.

46	97	Carcinoma Ductal Invasor (luminal)	-	-	POS	POS	NEG
47	33	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
48	42	Carcinoma Intraductal subtipo Comedocarcinoma	P	III	POS	POS	POS (3+)
49	62	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	NEG
50	72	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	POS	POS	POS (2+)
51	67	Carcinoma Ductal Invasor SOE associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	P	III	POS	POS	NEG (1+)
52	44	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	POS	POS	NEG
53	57	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS (3+)
54	62	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG (1+)
55	72	Carcinoma Ductal Invasor associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	A	II	POS	POS	NEG
56	62	Carcinoma Invasor Mucinoso, associado a carcinoma ductal invasor SOE	A	I	POS	POS	POS (3+)
57	86	Carcinoma Ductal Invasor associado a CDIS padrao sólido	A	III	POS	POS	NEG
58	45	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	POS (2+)
59	73	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
60	46	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Ductal in situ sólido cibriforme	P	III	POS	POS	NEG
61	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS (2+)
62	42	Carcinoma Ductal Invasor SOE	-	II	POS	POS	POS (3+)
63	50	Carcinoma Ductal invasor (40%) com áreas mucinosas (60%)	A	I	POS	POS	POS (3+)
64	84	Carcinoma Ductal Invasor; comedocarcinoma	P	III	NEG	NEG	POS (3+)
65	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
66	58	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
67	42	Carcinoma Ductal Invasor; associado a carcinoma in situ cribriforme	A	II	POS	POS	NEG (2+)
68	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG (1+)
69	78	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	NEG (0)
70	50	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG (1+)
71	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG (1+)
72	48	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG (0)

QUADRO 2 CONTINUA - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: O autor (2014)

LEGENDA: **Idade**, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **L**, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; **P**, presença; **A**, ausência; **G**, grau do tumor; **T**, tamanho do tumor em mm; **ER**, status do receptor de estrogênio; **PR**, status do receptor de progesterona; **HER2**, amplificação do oncogene *HER2*; **SOE**, sem outra especificação.

<b>73</b>	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG (0)
<b>74</b>	35	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG (0)
<b>75</b>	59	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG (+1)
<b>76</b>	68	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG
<b>77</b>	41	Carcinoma Ductal Invasor	P	(II/III)	NEG	NEG	NEG (0)
<b>78</b>	-	Carcinoma Ductal Invasor	A	I	POS	POS	NEG

QUADRO 2 CONCLUSÃO - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: O autor (2014)

LEGENDA: **Idade**, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **L**, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; **P**, presença; **A**, ausência; **G**, grau do tumor; **T**, tamanho do tumor em mm; **ER**, status do receptor de estrogênio; **PR**, status do receptor de progesterona; **HER2**, amplificação do oncogene *HER2*; **SOE**, sem outra especificação.

Subtipo	Número de amostras	Idade (Média)	Grau histológico	Metástase em Linfonodos
Triplo Negativo	11	50,3	Grau I (0%) Grau II (60%) Grau III (40%)	Ausente (45%) Presente (55%)
HER2 positivo	11	64,5	Grau I (0%) Grau II (30%) Grau III (70%)	Ausente (36%) Presente (64%)
Luminal A	28	61	Grau I (16%) Grau II (60%) Grau III (24%)	Ausente (52%) Presente (48%)
Luminal B	28	56,8	Grau I (23%) Grau II (50%) Grau III (27%)	Ausente (56%) Presente (44%)

QUADRO 3 - PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS GERAIS DOS SUBTIPOS MOLECULARES DAS AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA DESTE ESTUDO

FONTE: O autor (2014)

## 5.2 Extração de DNA

A extração de DNA de tumor mamário foi realizada a partir de um fragmento de cada amostra que foi homogeneizado no vórtex em 130  $\mu$ L de tampão de proteinase K e 70  $\mu$ L de proteinase K 10  $\mu$ g/mL e incubado em banho-maria a 55°C por 16 horas. Em seguida a proteinase K sofreu inativação por 10 minutos em banho seco a 95°C. Foi então adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico (25:24:1 v/v), seguido de homogeneização no vórtex por 15 segundos e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Após a retirada do sobrenadante da solução resultante, as etapas de adição de fenol, homogeneização e centrifugação

foram repetidas. Posteriormente à retirada do sobrenadante, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5 M. A solução foi mantida a -20 °C por 16 horas. Sendo em seguida centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos e seu sobrenadante descartado. Houve então adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspendido em 40 µL de água ultra pura.

As soluções de extração de DNA tiveram suas concentrações e qualidades determinadas pelo equipamento *Nanodrop®* 2000, e diluídas até uma concentração de 5 ng/µL.

### 5.3 PCR quantitativa em tempo real

Para determinação do número de cópias do gene *NTSR1* nas 78 amostras de DNA extraídos de tumor mamário foi empregada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

A avaliação do número de cópias do gene *NTSR1* foi realizada através do ensaio *TaqMan® Copy Number Assays* da empresa *Life Technologies™*. Esta metodologia é baseada em uma reação dupla de PCR em tempo real que detecta a sequência do gene alvo do estudo e a sequência de um gene de referência (*RNASE P*) conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diplóide. Este método de detecção relativa é usado para determinar o número de cópias do gene de interesse em um DNA de referência. Neste trabalho, para fins de simplificação, este ensaio (*TaqMan® Copy Number Assays*) será referido como qPCR.

Em todas as placas, contendo as amostras tumorais, foi incluído um DNA controle com o número de cópias dos genes de interesse conhecido. Este DNA controle é um DNA genômico composto por um *pool* de amostras de indivíduos que não apresentam a doença. Para cada reação foram utilizados: 5 µL de *Master Mix*, 2 µL de DNA (na concentração de 5 ng/µL), 0,5µL de *mix* do gene de estudo (contendo o par de *primers* e a sonda *TaqMan®*), 0,5 µL de *mix* do gene *RNASE P* (contendo os *primers* e a sonda *TaqMan®*) e 2 µL de água ultra pura, totalizando 10 µL de volume final de reação. Todas as amostras, incluindo o DNA controle, foram analisadas em triplicatas na placa. Os reagentes utilizados nestas reações de qPCR encontram-se descritos na TABELA 2. O equipamento utilizado para a realização deste trabalho foi o *Viiia 7 (Applied Biosystems™)*.



TABELA 2 - COMPONENTES DA REAÇÃO DA qPCR PARA ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE EM ESTUDO

Componente	Volume por reação (µL)
TaqMan Genotyping Master Mix (2x)	5,0
TaqMan Copy Number Assay (20x)	0,5
TaqMan Copy Number Reference Assay (20x)	0,5
Água ultra pura	2,0
DNA (5ng/µL)	2,0
<b>Volume total da reação (µL)</b>	<b>10,0</b>

FONTE: TaqMan® Copy Number Assays Protocol (Applied biosystems by life technologies)

As análises foram realizadas através do software *Copy Caller* (Life Technologies™). Foram desconsideradas as amostras que apresentaram valor de CT > 33 ciclos e valor de z-score ≥ 2.65. O número de cópias do DNA alvo foi calculado pelo método da quantificação relativa:  $2^{-\Delta\Delta CT}$  multiplicado por 2 (indivíduos diploides). Este método é adotado devido à padronização prévia dos ensaios dos *primers* e das sondas comercializados pela empresa que fornecem uma eficiência de reação de 100% possibilitando que as curvas de amplificação entre os genes alvos e o gene de referência possam ser comparadas com alta precisão.

#### 5.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados por testes não paramétricos Teste *t* de *Student* ou Teste de *Kruskal-Wallis* seguido da comparação entre os grupos pelo método de *Dunn*. Os resultados significativos alcançados pelos testes mencionados foram submetidos a uma análise de regressão linear. Para todas as análises foi utilizado o software *GraphPad Prism version 6.01* para *Windows* (Disponível em: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 6 RESULTADOS

A análise da CNA do gene *NTSR1* nas 78 amostras de câncer de mama utilizadas neste estudo revelou, de forma geral, um ganho no número de cópias (número de cópias >2) em 48 amostras (62%) (GRÁFICO 1). Observando-se, dessa forma, uma significativa influência do gene *NTSR1* em alguns parâmetros do câncer de mama apresentados a seguir.

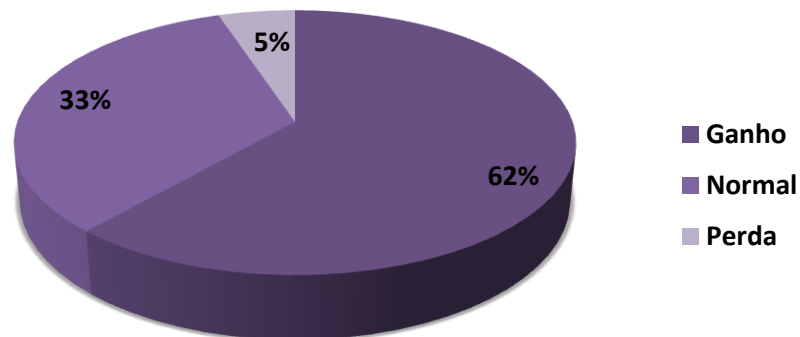


GRÁFICO 1 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* EM CARCINOMAS MAMÁRIOS

FONTE: O autor (2014)

### 6.1 Subtipos Moleculares

A avaliação da CNA do gene *NTSR1* nas 78 amostras dos quatro subtipos moleculares do câncer de mama (luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplo negativo) foi realizada através da técnica de qPCR usando o ensaio *TaqMan® Copy Number Assays*. Os GRÁFICOS 2, 3, 4 e 5 mostram o número de cópias do gene *NTSR1* para cada um dos subtipos. As médias do número de cópias para cada um deles foi de 2,46 para luminal A, 2,68 para luminal B, 4,65 para HER2 positivo e 4,93 para triplo negativo.

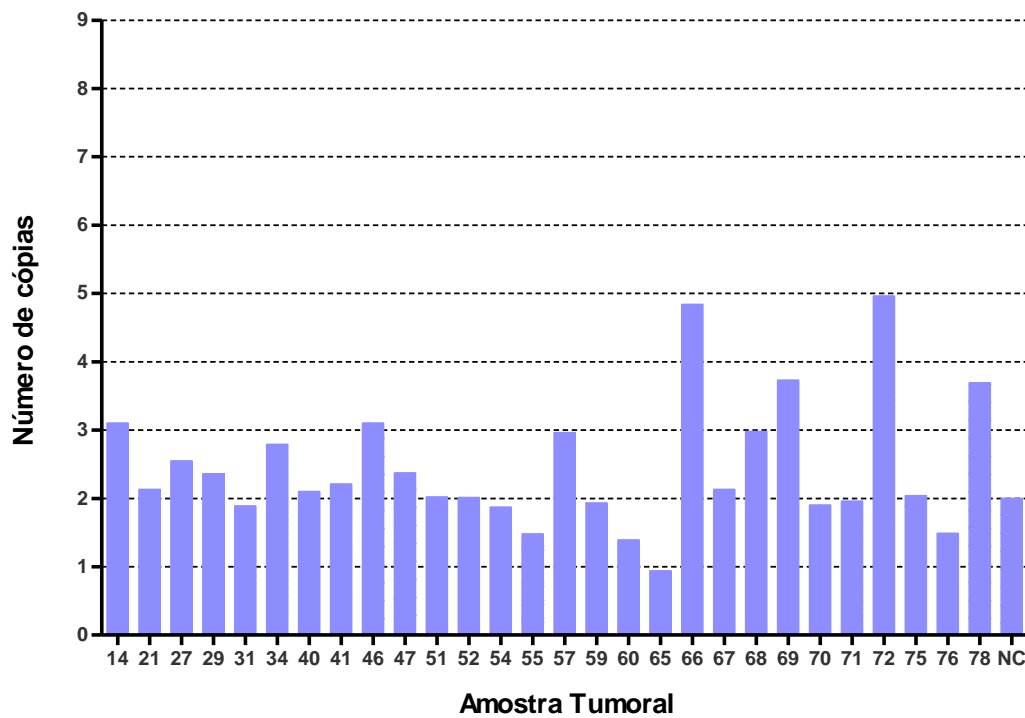


GRÁFICO 2 - NÚMERO DE CÓPIAS DAS AMOSTRAS TUMORAIS MAMÁRIAS DO SUBTIPO MOLECULAR LUMINAL A  
 FONTE: O autor (2014)  
 LEGENDA: **NC**, DNA controle.

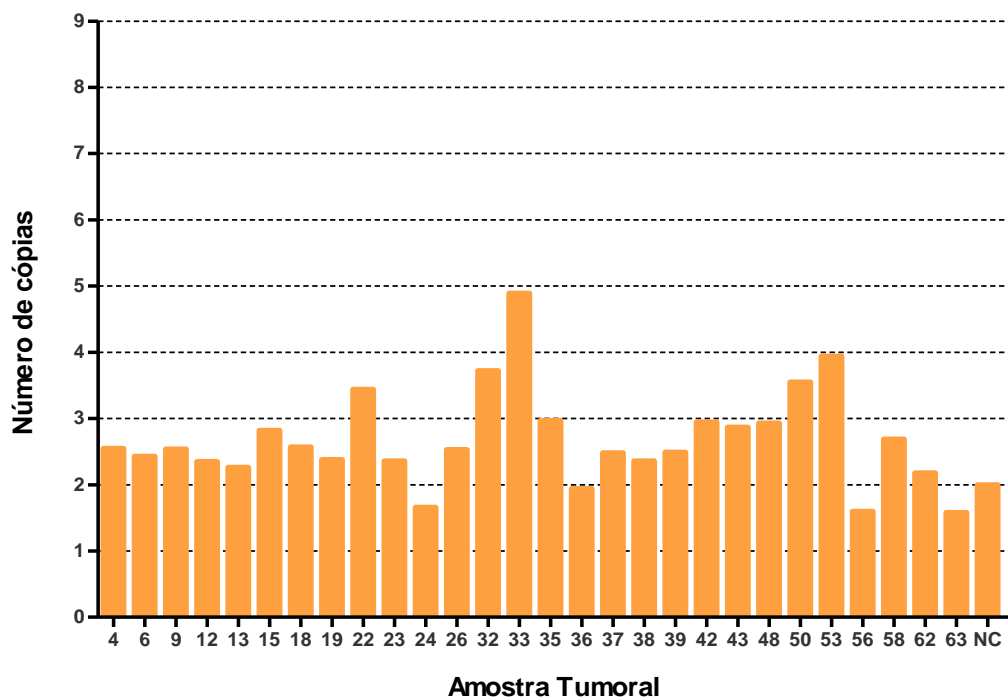


GRÁFICO 3 - NÚMERO DE CÓPIAS DAS AMOSTRAS TUMORAIS MAMÁRIAS DO SUBTIPO MOLECULAR LUMINAL B  
 FONTE: O autor (2014)  
 LEGENDA: **NC**, DNA controle.

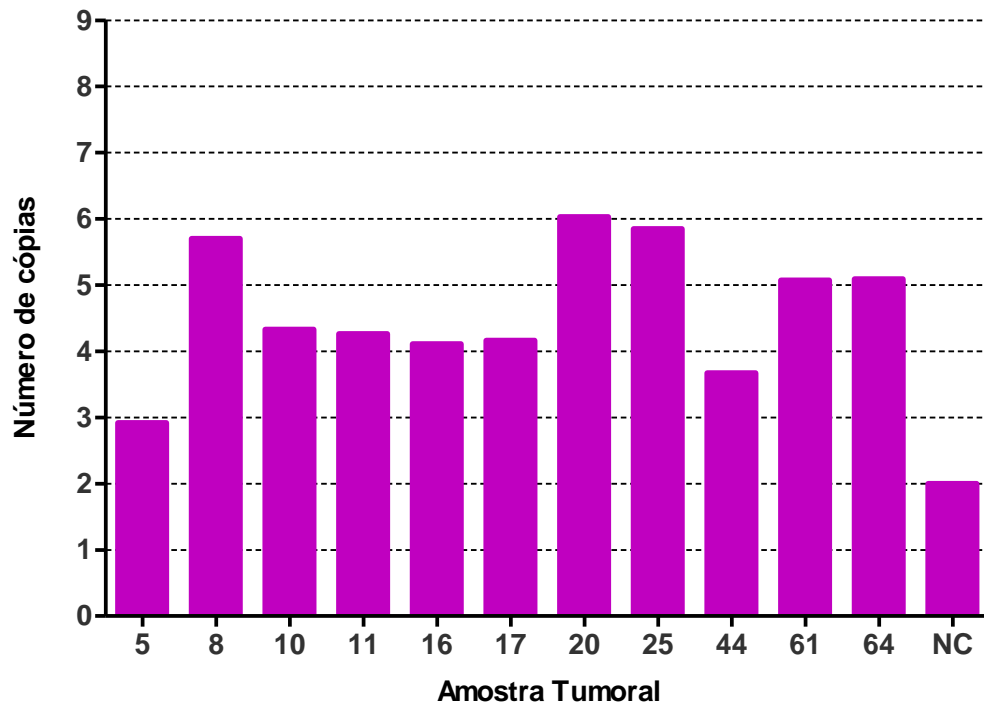


GRÁFICO 4 - NÚMERO DE CÓPIAS DAS AMOSTRAS TUMORAIS MAMÁRIAS DO SUBTIPO MOLECULAR HER2 positivo  
 FONTE: O autor (2014)  
 LEGENDA: **NC**, DNA controle.

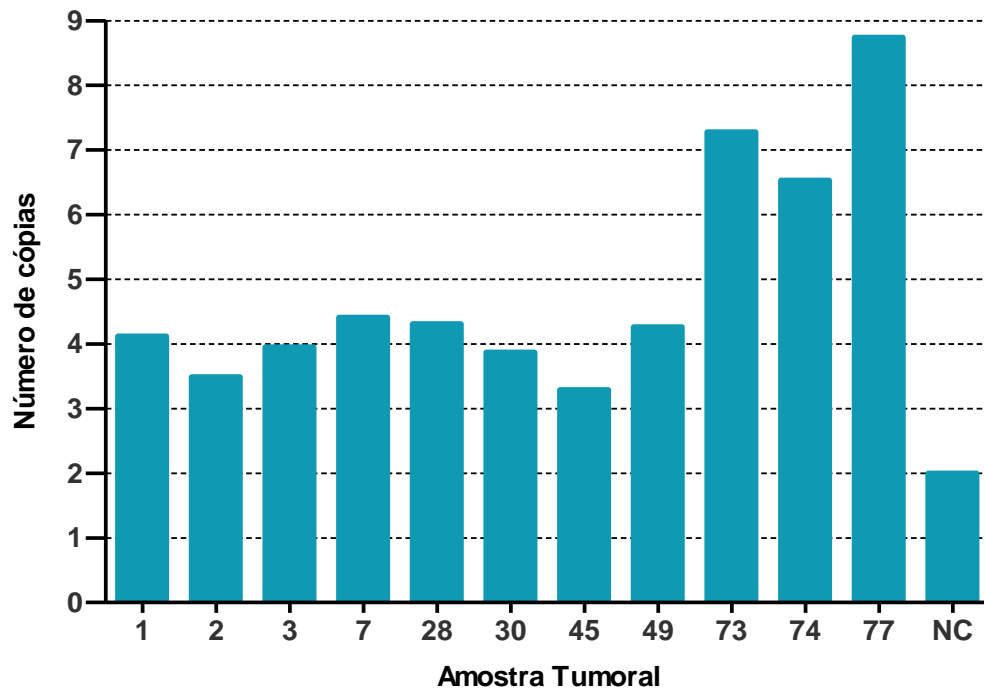


GRÁFICO 5 - NÚMERO DE CÓPIAS DAS AMOSTRAS TUMORAIS MAMÁRIAS DO SUBTIPO MOLECULAR TRIPLO NEGATIVO  
 FONTE: O autor (2014)  
 LEGENDA: **NC**, DNA controle.

Mediante a submissão dos dados obtidos ao teste de *Kruskal-Wallis* foi possível averiguar uma diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). O GRÁFICO 6 mostra a CNA para os grupos com as medianas e os percentis 25% e 75% (TABELA 3). Com o intuito de identificar entre quais grupos se encontravam esta diferença foi aplicado o método de *Dunn*, pelo qual se observou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os números de cópias das amostras dos grupos triplo negativo/luminal A, triplo negativo/luminal B, HER2 positivo/luminal A e HER2 positivo/luminal B. Não sendo verificada diferença entre os subtipos luminais e entre os subtipos triplo negativo e HER2 positivo.

Uma análise de regressão linear permitiu ainda, inferir que a CNA do gene *NTSR1* depende do subtipo de câncer de mama ( $b=0,9045$ ,  $r^2=0,4271$ ,  $p < 0,0001$ ). Os maiores ganhos do número de cópias do gene estão relacionados a subtipos moleculares mais agressivos de carcinoma mamário (triplo negativo e HER2 positivo) (GRÁFICO 7).

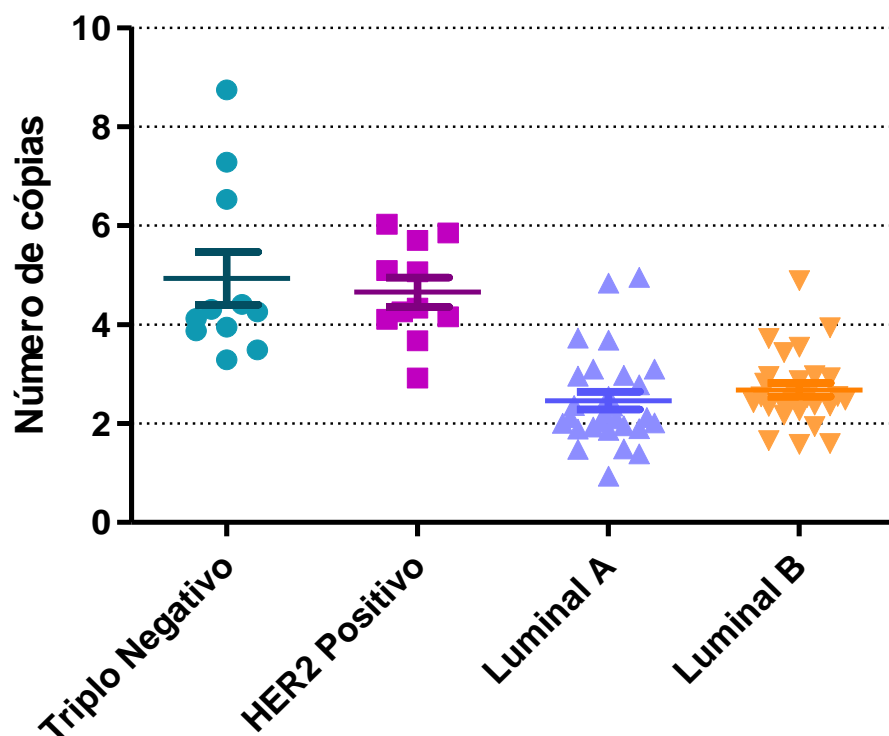


GRÁFICO 6 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA MAMÁRIO  
 FONTE: O autor (2014)

TABELA 3 - DADOS DO TESTE DE *KRUSKAL-WALLIS* DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* NOS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

Subtipo	Mediana	Percentil 25%	Percentil 75%	Mínimo	Máximo	Valor de p
Triplo Negativo	4,260	3,870	6,530	3,290	8,740	<0,0001
HER2 positivo	4,330	4,110	5,700	2,920	6,030	
Luminal A	2,130	1,908	2,975	0,940	4,960	
Luminal B	2,535	2,353	4,960	1,580	4,890	

FONTE: O autor (2014)

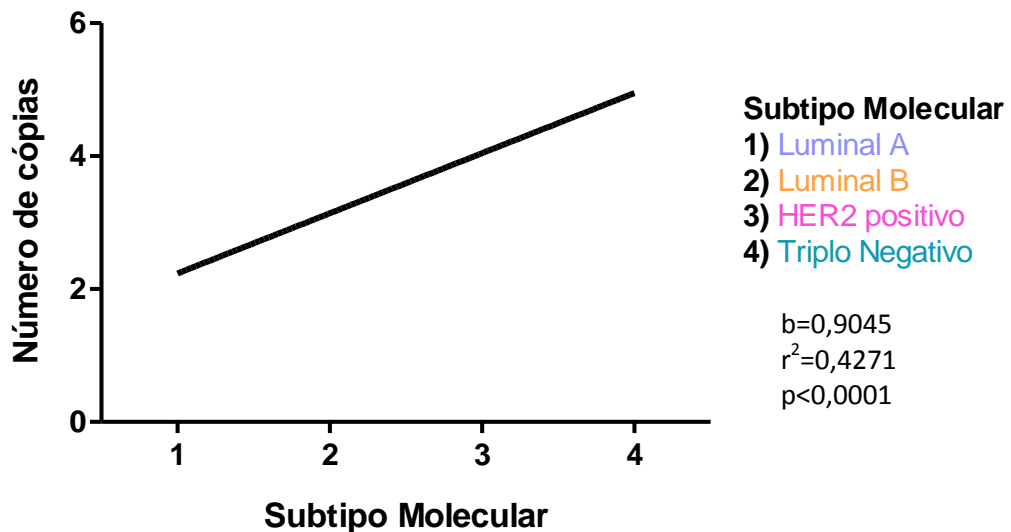


GRÁFICO 7 - ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR DAS ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* NOS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

FONTE: O autor (2014)

## 6.2 Idade

A CNA do gene *NTSR1* foi também avaliada em dois grupos de idade, pacientes em pré-menopausa e pacientes em pós-menopausa. Havia informações sobre a idade em que se iniciou a menopausa de algumas pacientes, mas para a grande maioria foi utilizado como critério de divisão a idade de 50 anos (idade média em que as mulheres entram na menopausa).

Excluindo-se cinco amostras, das quais não havia informação relativa à idade, a maioria das pacientes encontra-se em idade considerada pós-menopausa (68% conforme mostra o GRÁFICO 8).

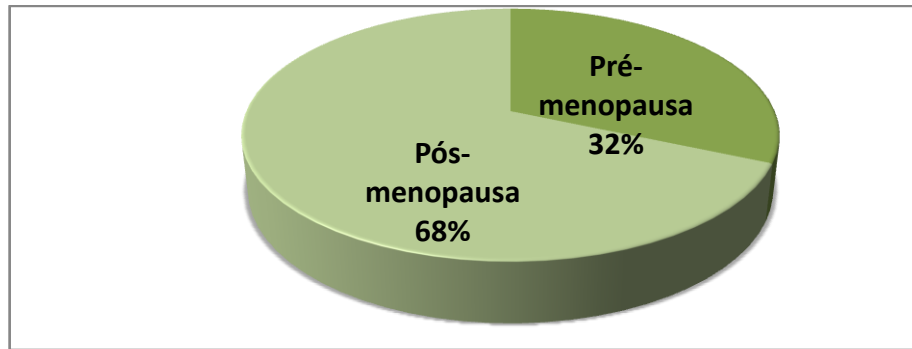


GRÁFICO 8 - DISTRIBUIÇÃO POR IDADE DAS PACIENTES ESTUDADAS NESTE TRABALHO  
 FONTE: O autor (2014)

A relação entre a CNA e a menopausa foi avaliada pelo teste *t* de *Student*, porém não houve significância estatística ( $p=0,2840$ ). O GRÁFICO 9 mostra esta relação.

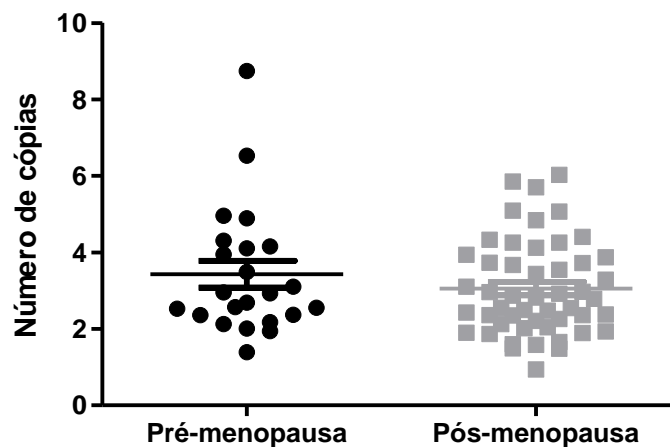


GRÁFICO 9 - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* NOS GRUPOS PRÉ E PÓS-MENOPAUSA DAS PACIENTES DESTE ESTUDO  
 FONTE: O autor (2014)

### 6.3 Metástase em Linfonodo Axilar

As amostras das pacientes deste estudo foram divididas entre presença ou ausência de metástase em linfonodo axilar. Cada um dos dois grupos contou com 38 pacientes, sendo que não foi possível classificar duas das 78 pacientes. Através do teste *t* de *Student* concluiu-se que não existe relação significativa entre a CNA do gene *NTSR1* e a presença ou ausência de metástase no linfonodo axilar ( $p=0,5356$ ) (GRÁFICO 10).

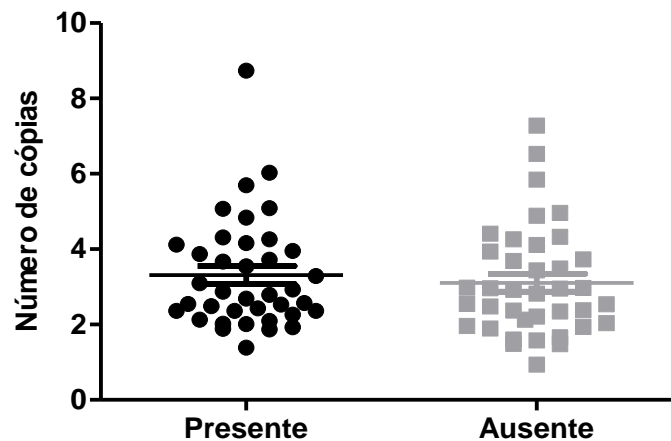


GRÁFICO 10 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE NTSR1 QUANTO A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE NOS LINFONODOS AXILARES EM PACIENTES COM CARCINOMA MAMÁRIO  
 FONTE: O autor (2014)

#### 6.4 Grau histológico

O grau histológico foi inserido como categoria 1 entre os fatores prognósticos para o câncer de mama por Fitzgibbons *et al.* (1999) e Hammond *et al.* (1999), sendo considerado, portanto, um importante parâmetro de avaliação da agressividade tumoral. Por isso, as pacientes foram classificadas em dois grupos: aquelas com tumor em grau histológico I e II (47 pacientes) e aquelas com grau histológico III (26 pacientes). Não havia informações sobre o grau histológico de cinco pacientes.

Após a submissão ao teste *t* de *Student* dos dados encontrados referentes à CNA do gene *NTSR1*, observou-se uma diferença significativa ( $p=0,0015$ ) entre os grupos, com um maior ganho do número de cópias nas amostras de grau histológico III (regressão linear,  $b=1,1111$ ,  $r^2=0,1327$ ,  $p=0,0015$ ) (GRÁFICOS 11 E 12).



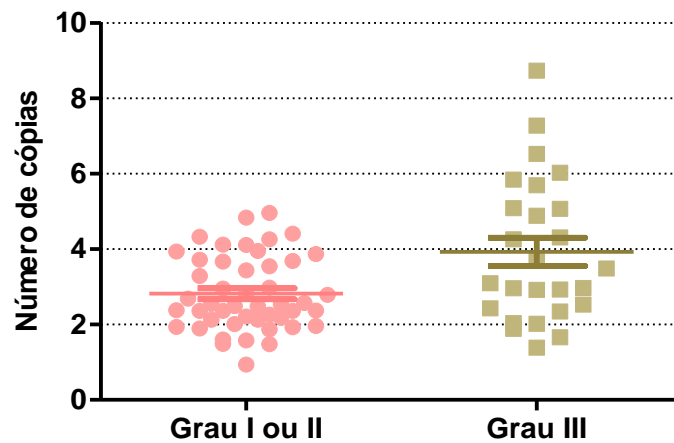


GRÁFICO 11 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* QUANTO AO GRAU HISTOLÓGICO EM AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO  
 FONTE: O autor (2014)

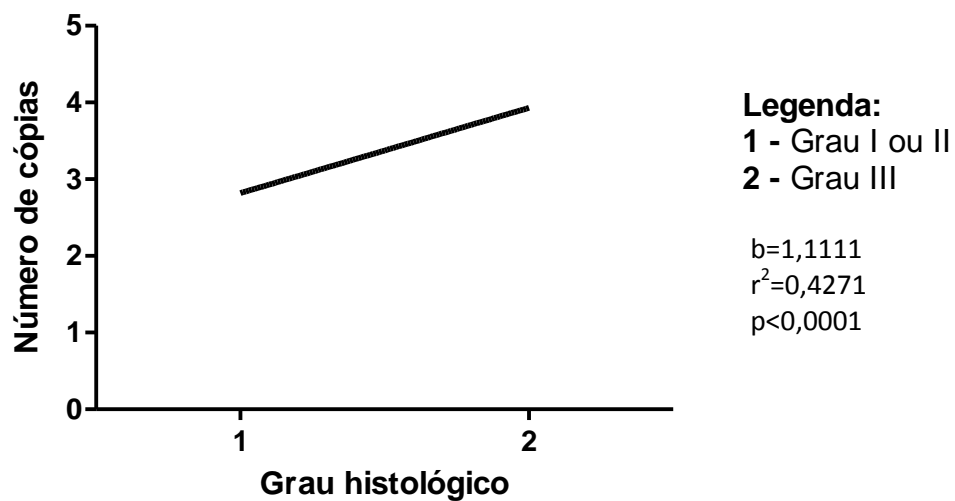


GRÁFICO 12 - ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *NTSR1* NOS DIFERENTES GRAUS HISTOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA  
 FONTE: O autor (2014)

## 7 DISCUSSÃO

O avanço de tecnologias em ensaios com genes e seus produtos têm permitido a criação de novas classificações do câncer de mama baseadas em padrões de expressão gênica e CNAs de genes (RAKHA *et al.*, 2010). O aprimoramento da classificação do câncer de mama em diversos subtipos possui grande relevância na realização de diagnósticos e desenvolvimento de tratamentos mais específicos de acordo com as características apresentadas por cada grupo. A necessidade de marcadores específicos é justificada inclusive pela epidemiologia da doença. O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente em mulheres no mundo, contribuindo com 23% dos novos casos de câncer por ano, sendo responsável por 14% do total de mortes por câncer (JEMAL *et al.*, 2011).

Através de seus receptores a NTS atua em diversas funções no sistema nervoso e periférico; em cânceres sua principal atuação é no crescimento celular (WU *et al.*, 2012). Embora existam outros receptores da NTS, o NTSR1 é o principal mediador da sua atuação na proliferação, migração, invasão e sobrevivência dos tumores (SOUAZÉ *et al.*, 2006). DUPOUY *et al.* (2009) concluíram que a NTS isolada não pode ser considerada um marcador no câncer de mama, pois seus efeitos oncogênicos só ocorrem em tumores que possuem expressão do NTSR1. Dessa forma, na última década, o NTSR1 tem sido associado à progressão tumoral em diversos tecidos (YOUNES *et al.*, 2014). A ação tumoral deste receptor envolve a ativação da rota Ras→Raf→Mek→Erk da cascata de sinalização das MAPKs. A Erk no final desta cascata atua na fosforilação de fatores de transcrição que irão regular genes reguladores do crescimento, além de conferir independência de ancoragem e perda de inibição por contato (WEINBERG, 2008; DUPOUY *et al.*, 2011).

O *NTSR1* não é expresso constitutivamente nas células normais do epitélio mamário, porém nas células tumorais são encontradas inclusive altas expressões desse gene. Uma hipótese para essa expressão anormal é a influência da via oncogênica de sinalização Wnt/APC na ativação do controle transcricional do gene *NTSR1* (DUPOUY *et al.*, 2009, 2011). A expressão protéica de NTSR1 pode ser aumentada pela alteração do número de cópias do segmento do cromossomo que contém o gene *NTSR1*. Os processos que dão origem a essas aberrações ainda não são completamente elucidados, porém sabe-se que segmentos de cromossomos com um ganho do número de cópias podem fazer com que os genes contidos na

região afetada tenham uma expressão amplificada (WEIR *et al.*, 2004; POLLACK *et al.*, 2002).

CHIN *et al.* (2006) encontraram uma relação entre a amplificação do número de cópias da região cromossômica 20q13 e a alta expressão de genes localizados na região em tumores de mama primários. Como continuidade do trabalho de TORRESAN (2011), que também encontrou alterações no número de cópias desta região cromossômica em câncer de mama, nós estudamos a alteração do número de cópias do gene *NTSR1* e encontramos um ganho do número de cópias em 62% das amostras de carcinoma mamário.

Esse resultado está em concordância com as pesquisas que vêm relatando expressão do gene *NTSR1* em câncer de mama (SOUAZÉ *et al.*, 2006; DUPOUY *et al.*, 2009, 2014). Estes estudos demonstram que o *NTSR1* participa da progressão neoplásica em câncer de mama em pelo menos 35% de todos os casos da doença.

A presença do *NTSR1* está fortemente relacionada com o carcinoma mamário ductal invasivo. Dentre as 78 amostras analisadas, 74 eram do tipo carcinoma ductal invasivo, e dentre essas 45 amostras (61%) apresentaram ganho do número de cópias do gene *NTSR1*. SOUAZÉ *et al.* (2006) observaram que 91% dos carcinomas ductais invasivos expressavam o gene; e DUPOUY *et al.* (2009) estimou positividade para *NTSR1* em 50-100% das amostras ductais invasivas.

Através do presente estudo foi possível demonstrar a relação do gene *NTSR1* com subtipos moleculares mais agressivos do câncer de mama, os tumores triplo negativos e os HER2 positivos, os quais apresentaram as maiores alterações do número de cópias do gene. DUPOUY *et al.* (2014) e YOUNES *et al.* (2014) constataram que, nos carcinomas de mama e pulmão, respectivamente, o complexo NTS/*NTSR1* estimula a expressão de HERs e EGFR, corroborando a relação entre o *NTSR1* e os tumores do subtipo HER2 positivo. Além disso, a baixa expressão de *NTSR1* é correlacionada à positividade de ER (DUPOUY *et al.*, 2009), característica comum dos subtipos luminal A e B, que apresentaram uma menor alteração do número de cópias do gene.

Além de estar relacionado aos subtipos de pior prognóstico, o *NTSR1* é também associado a outros parâmetros de prognóstico desfavorável. Nós observamos uma relação entre as maiores alterações do número de cópias do gene e grau histológico III do câncer de mama. Esta constatação corroborou outros estudos que verificaram a alta expressão do gene *NTSR1* em graus histológicos

mais avançados (SOUAZÉ *et al.*, 2006; DUPOUY *et al.*, 2009). Estes estudos demonstraram ainda que a alta expressão de NTSR1 é plausivelmente encontrada em carcinomas mamários de maior tamanho tumoral, com alta mortalidade e grande número de metástases em linfonodos. Porém, nós não encontramos relação significativa entre a alteração do número de cópias do gene *NTSR1* e metástases em linfonodos axilares.

Os métodos convencionais de tratamento do câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal. Mas na maioria dos casos, esses tratamentos somente oferecem às pacientes um suporte. Por isso, novas opções de tratamento são bem vindas no desenvolvimento terapêutico do câncer de mama (WU *et al.*, 2012). Além disso, novas abordagens terapêuticas podem solucionar a demanda por tratamentos específicos que esteja de acordo com as características de cada tipo tumoral. Como é o caso dos carcinomas mamários com fenótipo triplo negativo, que possuem uma carência por tratamentos específicos. O sistema da neurotensina representa um potencial alvo terapêutico no câncer de mama devido a frequente expressão do NTSR1, evidenciada por trabalhos de expressão gênica e alteração do número de cópias do gene *NTSR1*, e a sua relação com a progressão e a malignidade do tumor, verificados também neste trabalho.

Alguns estudos já demonstraram que uma interferência negativa sobre o NTSR1 resulta em redução do potencial de progressão tumoral. O tratamento de células de câncer colorretal injetadas em camundongo com um antagonista específico do NTSR1 (SR 48692) promoveu o controle do crescimento tumoral. Após o tratamento foi observada uma redução de 38% do volume tumoral (MAORET *et al.*, 1999). Moody e colaboradores (2001) demonstraram que este mesmo antagonista do NTSR1 é capaz de reduzir o número de colônias de uma linhagem de carcinoma de pequenas células de pulmão (*Small cell lung cancer*, SCLC) e também inibir a proliferação dessas células quando injetadas em camundongo. A inibição da expressão de NTSR1 em células da linhagem MDA-MB-231 injetadas em camundongo diminuiu o desenvolvimento tumoral comparado aos animais em que a expressão do NTSR1 não foi inibida (SOUAZÉ *et al.*, 2006). Um experimento semelhante a este foi realizado em células de câncer de pulmão e observou-se redução do crescimento tumoral e de metástases (YOUNES *et al.*, 2014).

Recentemente, Castillo-Rodríguez e colaboradores (2014) realizaram o tratamento de um modelo animal para câncer de mama triplo negativo com células

MDA-MB-231 com NTS-polyplex, o qual resultou em inibição do crescimento tumoral. NTS-polyplex são nanopartículas sintéticas que podem transferir um DNA plasmidial contendo como inserto um gene de interesse a células que possuam NTSR1 em sua membrana plasmática, incluindo células cancerosas. Neste estudo o gene inserido no DNA plasmidial foi o HSVtk, o qual está envolvido com a indução de apoptose. Diante destes estudos, é possível inferir que abordagens terapêuticas que incluam a inibição da expressão e função do NTSR1 apresentam um promissor potencial em pesquisas e na terapia do câncer de mama, particularmente no subtipo de fenótipo triplo negativo.

## 8 CONCLUSÃO

O gene *NTSR1* apresenta-se em diferentes níveis de alterações do número de cópias dependendo do subtipo do câncer de mama: luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplo negativo.

- O número de cópias é maior para os subtipos mais agressivos e de pior prognóstico, os tumores triplo negativos e HER2 positivos.
- A relação do gene *NTSR1* com um pior prognóstico no câncer de mama pode ser evidenciada também pelo significativo ganho do número de cópias em tumores com grau histológico III em relação aos tumores com grau histológico I e II. A associação entre a alteração do número de cópias do gene em estudo e os fatores de idade da paciente e presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares não é estatisticamente significativa.
- Os resultados encontrados corroboram aqueles descritos na literatura, visto que a maioria dos tumores analisados possui relação com o gene *NTSR1*, principalmente os tumores de pior prognóstico clínico. A alteração do número de cópias contribui para a sinalização desencadeada pela ativação da *NTSR1* que está envolvida na progressão tumoral do câncer de mama.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIZART, M.; SAUNUS, J.; CUMMINGS, M.; LAKHANI, S. R. Molecular classification of breast carcinoma. **Diagnostic Histopathology**, v. 18, n. 3, p. 97–103, 2012.
- BADVE, S.; DABBS, D. J.; SCHNITT, S. J.; *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern pathology**, v. 24, n. 2, p. 157–67, 2011.
- BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; CERVERA, N.; *et al.* How basal are triple-negative breast cancers? **International journal of cancer**, v. 123, n. 1, p. 236–40, 2008.
- BIRNER, M. J.; JOHNSON, M. E.; HAO, K.; *et al.* Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization analysis identified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 16, p. 2281–7, 2007.
- BRADBURY, A. R.; OLOPADE, O. I. Genetic susceptibility to breast cancer. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 8, n. 3, p. 255–67, 2007.
- CARRASCO, D. R.; TONON, G.; HUANG, Y.; *et al.* High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. **Cancer cell**, v. 9, n. 4, p. 313–25, 2006.
- CARRAWAY, R.; LEEMAN, S. E. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalam. **Journal of Biological Chemistry**, v.248, n.29, p. 6854-61, 1973.
- CASTILLO-RODRÍGUEZ, R. A; ARANGO-RODRÍGUEZ, M. L.; ESCOBEDO, L.; *et al.* Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. 1-12, 2014.
- CHIN, K.; DEVRIES, S.; FRIDLAND, J.; *et al.* Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 529–41, 2006.
- CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 3, p. 235–244, 2007.
- COOPER, G. M. M.; ZERR, T.; KIDD, J. M.; *et al.* Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide snp genotyping. **Nature genetics**. v. 40, n. 10, p. 1199-203, 2008.
- COX, M.; NELSON, D. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

DUMALAON-CANARIA, J. A.; HUTCHINSON, A. D.; PRICHARD, I.; WILSON, C. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. **Cancer causes & control : CCC**, 2014.

DUPOUY, S.; DOAN, V. K.; WU, Z.; MOURRA, N.; LIU, J. Activation of EGFR , HER2 and HER3 by neurotensin / neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8235–8251, 2014.

DUPOUY, S.; MOURRA, N.; DOAN, V. K.; *et al.* The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1369–78, 2011.

DUPOUY, S.; VIARDOT-FOUCAULT, V.; ALIFANO, M.; *et al.* The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. **PloS one**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2009.

EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

EVERS, B. M. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. **Peptides**, v. 27, n. 10, p. 2424–33, 2006.

FARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660–71, 2005.

FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; *et al.* Prognostic Factors in Breast Cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.124, p.966-78, 1999.

GOLDHIRSCH, A; WOOD, W. C.; COATES, A S.; *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 22, n. 8, p. 1736–47, 2011.

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

HAMMOND, M. E. H.; FITZGIBBONS, P. L.; COMPTON, C. C.; *et al.* College of American Pathologists Conference XXXV : Solid Tumor Prognostic Factors — Which , How and So What ? **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.124, p.958-65, 1999.

HERSCHKOWITZ, J. I.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V. J.; *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.



IARC. **Breast Cancer Screening**. 7th ed. Lyon, 2002.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2014: Incidências de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em novembro de 2014.

JAIN, A. N.; CHIN, K.; ERIKSTEIN, B. K.; *et al.* Quantitative analysis of chromosomal CGH in human breast tumors associates copy number abnormalities with p53 status and patient survival. **Pnas**, v. 98, n. 14, 2001.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

KALLIONIEMI, A. CGH microarrays and cancer. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 36–40, 2008.

KIM, M.-Y.; YIM, S.-H.; KWON, M.-S.; *et al.* Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. **Gastroenterology**, v. 131, n. 6, p. 1913–24, 2006.

LE, F.; GROSHAN, K.; ZENG, X. P.; RICHELSON, E. Characterization of the Genomic Structure, Promoter Region, and a Tetranucleotide Repeat Polymorphism of the Human Neurotensin Receptor Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1315–1322, 1997.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 10, p. 361-377, 2010.

LENZ, G. **Mecanismos de Transdução de Sinal Ativados por Purinas , Pirimidinas e Fatores de Crescimento em Culturas de Astrócitos**. 164 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

LI, J.; CHEN, C.; CHEN, C.; *et al.* Neurotensin receptor 1 gene (*NTSR1*) polymorphism is associated with working memory. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. 1-7, 2011.

LITAKER, D.; TOMOLO, A. Association of contextual factors and breast cancer screening: finding new targets to promote early detection. **Journal of women's health (2002)**, v. 16, n. 1, p. 36–45, 2007.

MA, H.; HUANG, Y.; ZHANG, B.; *et al.* Association between neurotensin receptor 1 (*NTR1*) gene polymorphisms and schizophrenia in a Han Chinese population. **Journal of molecular neuroscience**, v. 50, n. 2, p. 345–52, 2013.

MAORET, J.-J.; ANINI, Y.; ROUYER-FESSARD, C.; GULLY, D.; M, L. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture. **International Journal Cancer**, v. 454, n. 80, p. 448–454, 1999.

MENDRZYK, F.; RADLWIMMER, B.; JOOS, S.; *et al.* Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 34, p. 8853–62, 2005.

MOODY, T. W.; CHILES, J.; CASIBANG, M.; *et al.* SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. **Peptides**, v. 22, n. 1, p. 109–115, 2001.

NEWCOMB, P. A.; WERNLI, K. J. Risk Factors. In: E. R. Sauter; M. B. Daly. **Breast Cancer Risk Reduction and Early Detection**. Boston: Springer, 2010. p. 3-18.

OLDENBURG, R. A; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C. J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 63, n. 2, p. 125–49, 2007.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potencial Diagnostic and Therapeutic Applications. **The Oncologist**, v. 9, p. 361–377, 2004.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–52, 2000.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. R68, n. 12, p. 1-18, 2010.

POLLACK, J. R.; SORLIE, T.; PEROU, C. M.; *et al.* Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. **Pnas**, v. 99, n. 20, 2002.

RAKHA, E. A; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 120, n. 2, p. 293–308, 2010.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era : the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 207, n. 12, p. 1-12, 2010.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**, v. 378, n. 9805, p. 1812–23, 2011.

SCHNEBLE, E. J.; GRAHAM, L. J.; SHUPE, M. P.; *et al.* Future Directions for the Early Detection of Recurrent Breast Cancer. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 4, p. 291–300, 2014.

SOMAÏ, S.; GOMPEL, A.; ROSTÈNE, W.; FORGEZ, P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 482–488, 2002.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–74, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418–23, 2003.

SOUAZÉ, F.; DUPOUY, S.; VIARDOT-FOUCAULT, V.; *et al.* Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. **Cancer research**, v. 66, n. 12, p. 6243–9, 2006.

TLSTY, T.D.; CRAWFORD, Y.G.; HOLST, C.R.; FORDYCE, C.A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M.L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v. 9, n. 3, 2004.

TORRESAN C. **Identificação de marcadores moleculares em metástases de linfonodos sentinela mamários**. 168 f. Tese (Doutorado em Genética) – Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5846–53, 2006.

VINCENT, J.; MAZELLA, J.; KITABGI, P. Neurotensin and neurotensin receptors. **TIPS**, v. 20, n. July, p. 302–309, 1999.

VOGT, V.; SIEGEL, M.; SUNDMACHER, L. Examining regional variation in the use of cancer screening in Germany. **Social science & medicine**, v. 110, p. 74–80, 2014.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; 'T VEER, L. J. VAN. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591–602, 2005.

WEINBERG, R. A. O circuito de sinalização citoplasmática programa muitos dos traços de câncer. In:\_\_\_\_\_. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. p.159–208, 2008.

WEIR, B.; ZHAO, X.; MEYERSON, M. Somatic alterations in the human cancer genome. **Cancer cell**, v. 6, n. 5, p. 433-8, 2004.

WU, Z.; MARTINEZ-FONG, D.; TRÉDANIEL, J.; FORGEZ, P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, n. 184, p. 1-9, 2012.

YOUNES, M.; WU, Z.; DUPOUY, S.; *et al.* Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1 ) causes EGFR , HER2 and HER3 over-expression and their autocrine /

paracrine activation in lung tumors , confirming responsiveness to erlotinib.  
**Oncotarget**, v. 5, n. 18, 2014.

ZHANG, D.; QIAN, Y.; AKULA, N.; *et al.* Accuracy of CNV Detection from GWAS  
Data. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2011.