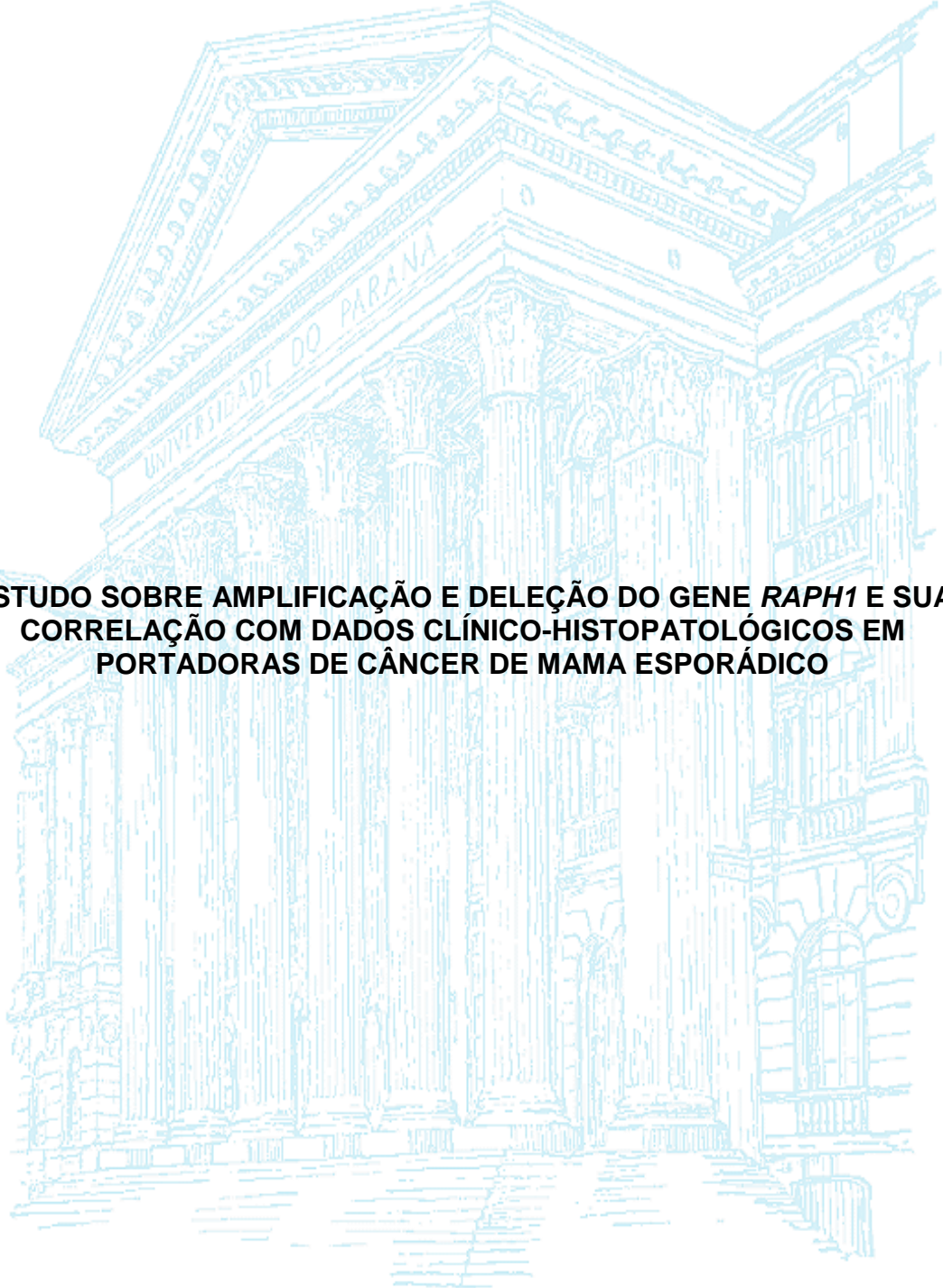


MEIRE SILVA BATISTELA



**ESTUDO SOBRE AMPLIFICAÇÃO E DELEÇÃO DO GENE *RAP1* E SUA
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS EM
PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

**CURITIBA
2012**

MEIRE SILVA BATISTELA

**ESTUDO SOBRE AMPLIFICAÇÃO E DELEÇÃO DO GENE *RAPH1* E SUA
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS EM
PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof^o. Dr. Ricardo L.R. de Souza.

**CURITIBA
2012**

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **MEIRE SILVA BATISTELA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

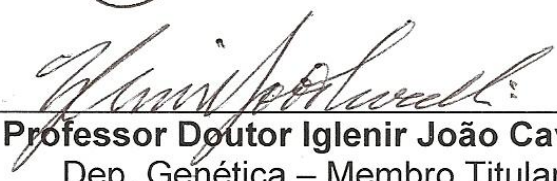
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2012



Professor Doutor Atila Visinoni

Universidade Positivo – Membro Titular



Professor Doutor Iglénir João Cavalli

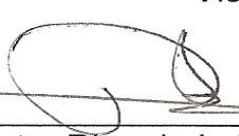
Dep. Genética – Membro Titular



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Dep. Genética/UFPR – Orientador e Presidente da Banca

Visto



Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG-GEN-UFPR
nº 176708

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para sua realização. Em especial à minha família, verdadeiros amigos e ao meu amor pela paciência, apoio e compreensão.

*“A sua única e verdadeira limitação é aquela
que você aceita e define em sua
própria mente.”*

Napoleon Hill

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof^o Dr. Ricardo L.R de Souza pelo suporte e credibilidade em meu trabalho. Agradeço também à Prof^a Dra. Lupe Furtado Alle e à Prof^a Dra. Eleidi Chautard-Freire-Maia por estarem sempre dispostas a me ajudar a solucionar os problemas que encontrei pelo caminho e contribuir da melhor maneira possível, assim como à Prof^a Dra Marina Isabel M. de Almeida pela excelente ajuda estatística de última hora.

Um muito obrigado aos Professores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Prof^a Dra. Enilze Ribeiro e Prof^o Dr. Iglénir Cavalli por cederem suas amostras e seu laboratório para que eu pudesse desenvolver parte da minha prática laboratorial. Agradeço também a todos os alunos deste laboratório pela paciência, em especial a Doutoranda Sarah Oliveira que foi quem me socorreu desde o início da jornada, sempre muito prestativa e atenciosa.

Agradeço às minhas queridas amigas e “companheiras de aventuras” Manu, Nalini, Fabi e Nathi pelas risadas, momentos de descontração e também de choradeira (inevitáveis). Assim como aos meus colegas de laboratório por me disponibilizarem um excelente local de trabalho, em especial ao Maicon e a Michelli por toda a ajuda.

Meu agradecimento mais que especial à minha grande amiga Dellyana Boberg, a qual foi mais que parceira e colega de trabalho, foi a minha muleta de apoio, o meu lado direito do cérebro, sem a qual não teria percorrido nem metade do caminho. Muito obrigada pelo ombro pra chorar quando os reagentes não chegavam, ou quando a curva padrão não saía (hehe), ou quando o *RAPH1* não funcionava, pelas ótimas idéias de última hora e acima de tudo por eu ter tido o privilégio de conviver com uma pessoa tão maravilhosa e competente.

Muito obrigada a todos da minha família, pai, mãe, irmã e irmão (cunhado) que estiveram presentes acompanhando tanto os meus desesperos quanto as minhas alegrias no decorrer destes dois anos, sempre me apoiando em minhas escolhas. Não poderia deixar de agradecer também ao meu namorado Rafael que teve toda a paciência do mundo e me suportou em momentos que nem eu mesma conseguia, pelo carinho e por toda a ajuda desde o início.

Meu agradecimento a todos os meus amigos, aos que estiveram presentes e também aos que estiveram ausentes (muitas vezes por necessidade). Obrigada por todo o apoio, suporte e por me darem a certeza e o alívio de saber que não estou sozinha neste mundo.

Agradeço à Aline Freund, uma boa alma que apareceu com dicas e conselhos valiosíssimos na hora em que tudo parecia perdido.

Acima de tudo agradeço ao NanoDrop 2000c e a Taq Platinum® por salvarem as minhas curvas-padrão e me devolverem um projeto de mestrado que eu acreditava estar perdido 😊.

E por fim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma estiveram envolvidos para que esta dissertação pudesse ser desenvolvida, entre eles todos do Departamento de Genética.

RESUMO

A proteína Lamelipodina (Lpd), codificada pelo gene *RAPH1*, funciona como adaptadora de sinais para modular a montagem do citoesqueleto de actina, através de sua ligação às proteínas Ena/VASP, e atua na protrusão lamelipodial e motilidade celular. A região a qual pertence o gene *RAPH1* (2q33) já foi descrita como deletada em diversos tipos de cânceres e a expressão do gene já se mostrou alterada em cânceres quando comparada a tecidos normais. Optou-se neste trabalho por investigar alterações estruturais (amplificações e deleções) do gene *RAPH1* em amostras de carcinoma mamário, a fim de determinar sua possível relação com os processos de tumorigênese e metástase. Foram utilizadas amostras de tumor para 52 pacientes nas quais o sangue periférico foi utilizado como controle. As alterações do gene *RAPH1* foram determinadas a partir da quantificação relativa e do método da curva padrão, por meio da técnica PCR em Tempo Real. O gene *RAPH1* se mostrou alterado em todas as amostras analisadas, sendo em sua maioria alterações do tipo deleção (63,5%) e nas demais amostras o gene se mostrou amplificado (36,5%). Foram realizadas análises de regressão e correlação entre as amplificações e deleções do gene *RAPH1* e dados clínico-histopatológicos das pacientes a fim de determinar alguma relação causal entre as variáveis, no entanto os valores obtidos não se mostraram significativos para nenhuma das características. A partir dos resultados foi possível concluir que as alterações estruturais do gene *RAPH1* não influenciam diretamente o processo de tumorigênese em carcinomas mamários e que as amplificações e deleções encontradas também não são responsáveis por aumentar ou diminuir a motilidade celular e por consequência a incidência de metástase nos linfonodos, em pacientes com câncer de mama. Foram encontradas correlações positivas para as alterações estruturais do gene *RAPH1* e o gene das colinesterases (*ACHE* e *BCHE*), no entanto esta relação não pôde ser considerada uma influência direta para o desenvolvimento e/ou progressão de tumores de mama, uma vez que as alterações estruturais dos genes em separado já não possuem contribuição efetiva.

Palavras-chave: Lamelipodina. *RAPH1*. Amplificação e deleção gênica. Câncer de mama. PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

The Lamellipodin protein (Lpd), encoded by the *RAPH1* gene, functions as signal adapter to modulate the assembly of actin cytoskeleton through its binding to the Ena/VASP proteins, and works in lamellipodial protrusion and cellular motility. The region which the *RAPH1* gene belongs (2q33) has been described as deleted in various cancer types and the gene expression changes in cancers when compared to normal tissues. This work chose by investigate structural alterations (amplifications and deletions) in the *RAPH1* gene on mammary carcinoma samples in order to determine its possible relationship with the processes of tumorigenesis and metastasis. Tumor samples were used for 52 patients in which the peripheral blood was used as a control. The changes of the *RAPH1* gene were determined from the relative quantification and standard curve method, through Real Time PCR technique. The *RAPH1* gene proved to be changed in all samples analysed, being mostly changes deletions (63.5%) and in other samples the gene showed amplified (36.5%). Regression and correlation analyses were conducted between gene amplifications and deletions of the *RAPH1* gene and clinico-histopathological data from patients in order to determine any causal relationship between the variables, however the values obtained were not significant to none of the features. Based on the results was possible to conclude that the structural changes of the *RAPH1* gene do not influence directly the process of tumorigenesis in breast carcinomas. Besides that the amplifications and deletions found are not also responsible for increase or decrease cellular motility and consequently the incidence of lymphnode metastasis in patients with breast cancer either. Positive correlations were found for structural changes between the *RAPH1* gene and the cholinesterases genes (*ACHE* and *BCHE*), however this relationship could not be considered a direct influence to development and/or progression of breast tumors, since the structural changes of separate genes already do not have effective contribution.

Key-words: Lamellipodin. *RAPH1*. Genic amplification and deletion. Breast Cancer. Real Time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – GENE <i>RAPH1</i> E SUAS FORMAS ALTERNATIVAS	3
FIGURA 2 – SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE <i>RMO1</i>	4
FIGURA 3 – DOMÍNIOS DA LPD, RIAM E MIG-10 E SUAS RELAÇÕES EVOLUTIVAS.....	5
FIGURA 4 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEINA LPD.....	7
FIGURA 5 – ALTERAÇÕES CELULARES E CÂNCER.....	12
FIGURA 6 – ANATOMIA DA MAMA FEMININA.	14
FIGURA 7 – FASES DA PCR EM ESCALA LOGARÍTMICA	24
FIGURA 8 – SONDA LIGADA À FITA DE DNA	25
FIGURA 9 – LIBERAÇÃO DOS FLUORÓFOROS PELA POLIMERASE.....	26
FIGURA 10 – CURVA DE AMPLIFICAÇÃO.....	26
FIGURA 11 – CURVA PADRÃO OBTIDA PARA O GENE <i>RAPH1</i>	32
FIGURA 12 - CURVA PADRÃO OBTIDA PARA O GENE <i>PUM1</i>	33
FIGURA 13 - GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDO PARA UMA DAS PLACAS REALIZADAS PARA O GENE <i>RAPH1</i>	34
FIGURA 14 – CURVA PADRÃO PARA O GENE <i>18S</i> E CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DE UMA AMOSTRA CONTROLE.	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS.....	21
TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DOS GENES DE REFERÊNCIA E DO GENE ALVO.....	28
TABELA 3 – VALORES DE <i>SLOPE</i> , R_2 E EFICIÊNCIA (E) OBTIDOS PARA TODOS OS GENES.....	35
TABELA 4 – VALOR MÉDIO DE Q, MÉDIA DOS DESVIOS E TIPO DE ALTERAÇÃO ENCONTRADA.....	37
TABELA 5 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS OU DELETADAS PARA O GENE <i>RAPH1</i>	39
TABELA 6 – VALORES OBTIDOS A PARTIR DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO UTILIZANDO AS ALTERAÇÕES DO GENE <i>RAPH1</i> COMO VARIÁVEL INDEPENDENTE.....	40

TABELA 7 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE <i>SPEARMAN</i> (ρ) ENTRE O GENE <i>RAPH1</i> E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS.	41
TABELA 8 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE <i>SPEARMAN</i> (ρ) ENTRE AS ALTERAÇÕES DO GENE <i>RAPH1</i> E AS COLINESTERASES.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PARA O GENE <i>RAPH1</i>	38
GRÁFICO 2 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE O GENE <i>RAPH1</i> E <i>ACHE</i>	43
GRÁFICO 3 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE O GENE <i>RAPH1</i> E <i>BCHE</i>	43
GRÁFICO 4 – AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES DOS GENES <i>RAPH1</i> E <i>ACHE</i>	44
GRÁFICO 5 – AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES DOS GENES <i>RAPH1</i> E <i>BCHE</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	GENE <i>RAPH1</i>	3
2.2	PROTEÍNA LAMELIPODINA HUMANA	5
2.2.1	Domínios estruturais	5
2.2.2	Funções	8
2.3	CÂNCER	10
2.4	CÂNCER DE MAMA	14
2.5	CÂNCER, GENE <i>RAPH1</i> E LAMELIPODINA	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Caracterização da Amostra	20
4.2	Coleta e Armazenamento das Amostras	22
4.3	Extração do DNA Sangüíneo	22
4.4	Extração de DNA do Tecido Tumoral	23
4.5	Quantificação do gene <i>RAPH1</i> por PCR em Tempo Real (qPCR)	23
4.6	Análise pela Construção da Curva Padrão	27
4.7	Análise dos dados	27
4.8	Oligonucleotídeos iniciadores	28
4.9	Amplificação por qPCR e padronização	29
4.10	Análises Estatísticas	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Construção da Curva Padrão	31
5.2	Amplificação por PCR em Tempo Real	34
5.3	Alteração do número de cópias do gene <i>RAPH1</i>	35
5.4	Amplificações e deleções do gene <i>RAPH1</i> e dados clínico- histopatológicos	39
5.5	Amplificações e deleções do gene <i>RAPH1</i> e genes <i>ACHE</i> e <i>BCHE</i> ..	41
6	DISCUSSÃO	45
6.1	Alterações do gene <i>RAPH1</i> e câncer	45

6.2	Amplificações e deleções do gene <i>RAPH1</i> e dados clínico-histopatológicos.....	46
6.3	<i>RAPH1</i> e as colinesterases.....	49
7	CONCLUSÕES	51
8	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO	622
	APÊNDICE	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer se desenvolve devido a falhas nos mecanismos responsáveis por controlar a proliferação e crescimento normal das células, que se dividem de maneira rápida e descontrolada gerando massas de células anormais, chamadas tumores (NUSSBAUM *et al.*, 2001). A transformação de células normais em células tumorais envolve um conjunto de alterações genéticas e/ ou epigenéticas em genes importantes no controle celular, denominados de proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Além das alterações genéticas, influências ambientais também são determinantes no desenvolvimento do câncer (HUNT *et al.*, 2001; KVIKTO, 2003).

O câncer de mama é uma doença na qual células epiteliais e estromais do tecido mamário sofrem alterações moleculares e histopatológicas que determinam sua malignidade (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). Com estimados 1.152.161 novos casos por ano, o câncer de mama feminino é o segundo câncer mais comum no mundo e o mais comum entre as mulheres, responsável por cerca de 400 mil mortes anuais (KAMANGAR *et al.*, 2006).

O objetivo de muitos estudos sobre o câncer de mama é a identificação de genes que estejam relacionados à progressão de células normais a malignas, e que tal informação possa servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e terapêutica mais eficientes (TLSTY *et al.*, 2004).

O gene *RAPH1* (*Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1*) humano consiste de 17 exons e está localizado no braço longo do cromossomo 2, região 3, banda 3 (2q33). Diversas possibilidades de processamentos alternativos já foram descritos para o *mRNA* do gene, os quais resultam em transcritos que codificam uma proteína com maior ou menor número de aminoácidos (EPPERT *et al.*, 2005).

A proteína Lamelipodina humana (Lpd), codificada pelo gene *RAPH1*, pertence à família de proteínas MRL. Esta família é característica por possuir os domínios PH (*pleckstrin homology*), RA (*Ras-association*) além de um polipeptídeo rico em prolina na região C-terminal. Estes domínios são sítios de ligação que estão associados à membrana celular, à sinalização, e às proteínas Ena/VASP, respectivamente. A proteína Lpd funciona como adaptadora de sinais para modular a montagem do citoesqueleto de actina através das proteínas Ena/VASP (LAFUENTE *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2004), relacionadas com a protrusão lamelipodial e a motilidade celular.

A região onde está localizado o gene *RAPH1* (2q33) está deletada em diversos tipos de cânceres, além de alguns trabalhos terem sugerido que ele possa ser expresso de maneira diferente em tecidos tumorais quando comparado a tecidos normais (DAHL *et al.*, 2005; EPPERT *et al.*, 2005). Dessa maneira, o gene *RAPH1* pode desempenhar um importante papel na origem e/ou progressão do câncer de mama assim como nos demais tipos de câncer, e seu estudo pode levar a descrição de um novo alvo molecular para a intervenção terapêutica e desenvolvimento de novos tratamentos (LYULCHEVA *et al.*, 2008) principalmente nas vias que acarretam em aumento da motilidade celular e metástase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENE *RAPH1*

O gene humano *RAPH1* (*Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1*) foi identificado por Nagase e colaboradores em 2000 como localizado no braço longo do cromossomo 2 (NAGASE *et al.*, 2000) e denominado de *KIAA1681*.

EPPERT *et al.* (2005), ao investigarem a expressão de uma série de genes em amostras de osteossarcomas, identificaram o gene *RMO1* (*reduced expression in metastatic osteosarcoma*) incluindo suas nove formas alternativas (Figura 1A). O gene *RMO1* foi localizado na posição 2q33, e uma de suas formas alternativas foi denominada de *RMO1-RAPH1* e posteriormente de *RAPH1* (DAHL *et al.*, 2005).

O gene *RAPH1* consiste de 17 exons (Figura 1B). Existem duas regiões de processamento alternativo (exons 5 e 6) localizadas no interior do gene. O transcrito do exon 15 possui uma região que pode se ligar tanto com o transcrito do exon 16, quanto com o do 17. Todas as possibilidades de processamentos descritas podem resultar em transcritos alternativos do gene resultando em uma proteína com maior ou menor número de aminoácidos (Figura 1A) (EPPERT *et al.*, 2005).

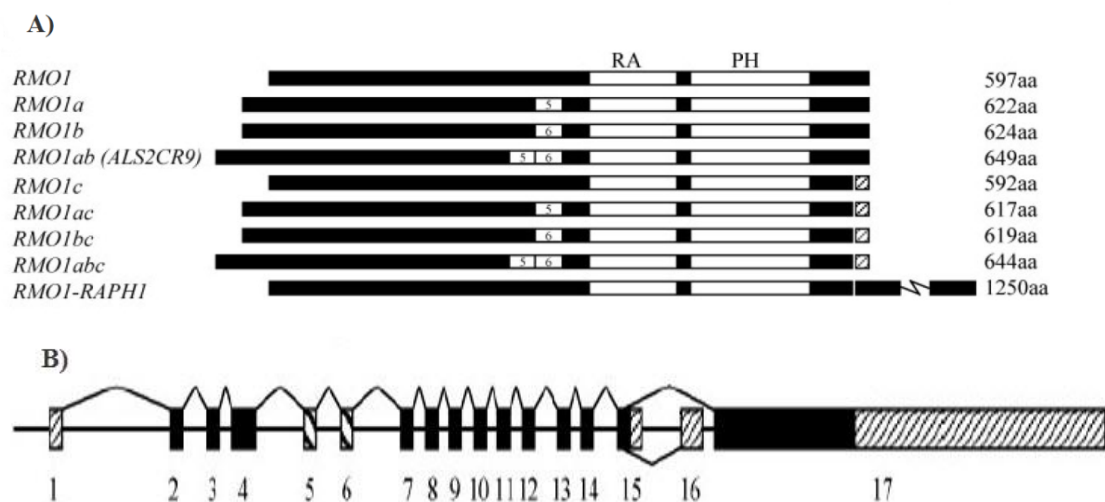


FIGURA 1 – A) FORMAS ALTERNATIVAS DO TRANSCRITO DO GENE *RMO1*, ENTRE ELAS A FORMA *RAPH1*. B) ESTRUTURA DO GENE *RAPH1*. FONTE: ADAPTADO DE EPPERT *et al.*, (2005). LEGENDA: A região hachurada não é traduzida. Os transcritos dos exons 5 e 6 podem sofrer processamento alternativo. O transcrito do exon 15 contém uma região críptica de processamento alternativo que quando utilizada pode se ligar ao transcrito do exon 16 ou 17.

Também foi verificado por EPPERT *et al.* (2005) a existência de homologia entre a sequência do gene *RMO1* (*RAPH1*) e as sequências dos genes que codificam as proteínas humanas Grb7, Grb10 e Grb14 (29% a 35% de identidade), e MIG10, encontrada em *C. elegans* (42% de identidade) (Figura 2) estando tanto as proteínas Grb (7,10 e 14) quanto MIG-10 envolvidas na proliferação e migração celular (MANSER *et al.*, 1990; MANSER *et al.*, 1997; DALY, 1998; HAN *et al.*, 1999; HAN *et al.*, 2000; HAN *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2002; JAHN *et al.*, 2002).

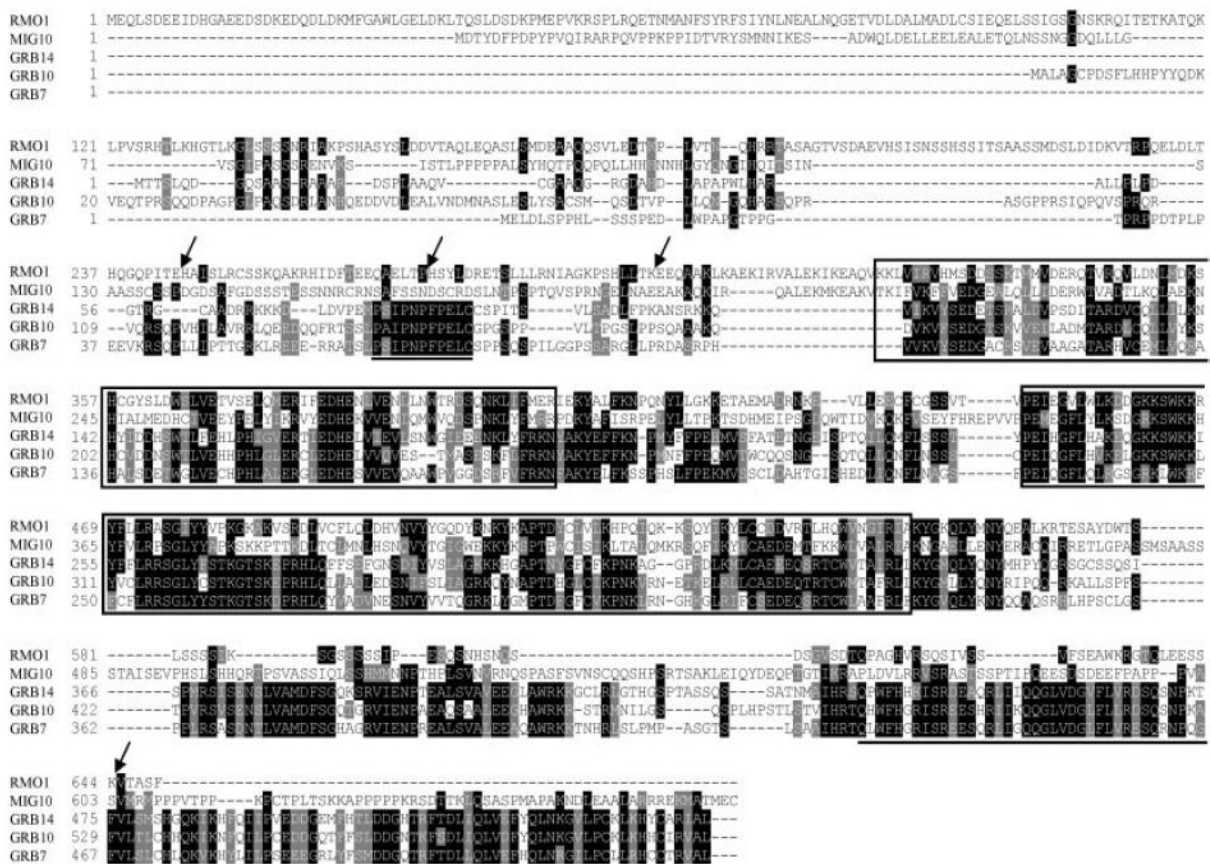


FIGURA 2– SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE *RMO1*. FONTE: EPPERT *et al.*, (2005). LEGENDA: Sequência completa codificadora de *RMO1* alinhada com Grb7, 10, 14 e MIG10. As setas denotam as regiões de processamento alternativo de *RMO1*. O domínio RA e o domínio PH de *RMO1* estão nas caixas (aa321–405 e aa449–555, respectivamente) e a região rica em prolina e o domínio SH2 das proteínas GRB estão sublinhados. A região destacada em preto representa aminoácidos com a mesma identidade e a região em cinza aminoácidos similares (THOMPSON *et al.*, 2006).

2.2 PROTEÍNA LAMELIPODINA HUMANA

2.2.1 Domínios estruturais

A proteína Lamelipodina humana (Lpd), codificada pelo gene *RAPH1*, possui 1250 aminoácidos e juntamente com as proteínas RIAM e MIG-10 (encontrada em *C. elegans*), relacionadas evolutivamente (Figura 3A), são parte da família de proteínas MRL (MIG-10, RIAM e Lamelipodina). Esta nova família proposta por KRAUSE *et al.* (2004) é característica por possuir os domínios PH (*pleckstrin homology*), RA (*Ras-association*) além de um polipeptídeo rico em prolina na região C-terminal (Figura 3B). Estes domínios são sítios de ligação que estão associados à membrana celular, à sinalização, e às proteínas Ena/VASP, respectivamente. As proteínas MRL funcionam como adaptadores de sinais para modular a montagem do citoesqueleto de actina através das proteínas Ena/VASP (LAFUENTE *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2004), intimamente relacionadas com a protrusão lamelipodial e a motilidade celular.

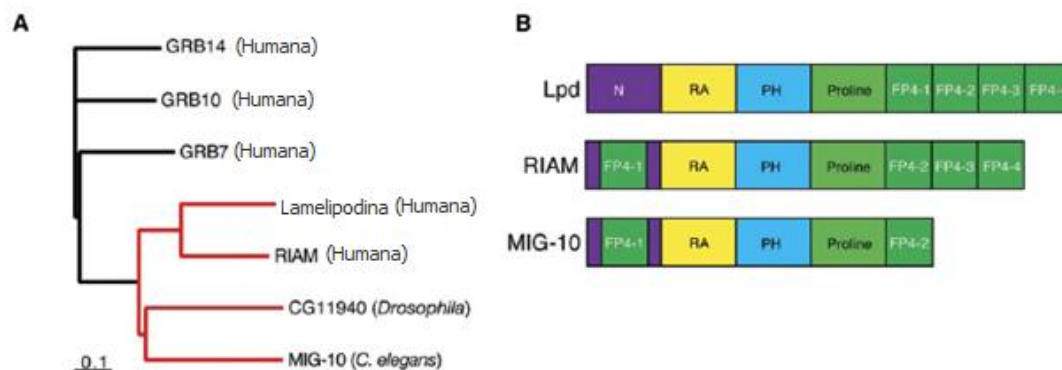


FIGURA 3 – A) ÁRVORE FILOGENÉTICA DA RELAÇÃO EVOLUTIVA DA LAMELIPODINA COM AS PROTEÍNAS RIAM E MIG-10. FONTE: CHANG *et al.*, (2006). LEGENDA: A) A distância horizontal representa o grau de divergência e a barra de escala no canto inferior 10% de eventos de substituição. B) Representação esquemática dos domínios das proteínas Lamelipodina, RIAM e MIG-10. N representa a região amino-terminal; RA – domínio *Ras association*; PH – domínio *Pleckstrin Homology*; Proline, domínio rico em prolina; FP4, motivos que contêm FPPPP para ligação aos domínios EVH1 nas Ena/VASP.

As proteínas Ena/VASP (em mamíferos Mena - *mammalian enabled*, VASP - *vasodilator stimulated phosphoprotein* e EVL - *Ena VASP like*) são definidas estruturalmente por um domínio rico em prolina (o qual é importante para interações com a proteína ligadora de actina, Profilina) flanqueado pelos domínios amino-terminal EVH1 e carboxi-terminal EVH2 (Ena/VASP homology 1 e 2). O domínio EVH1 reconhece sequências (D/E) FPPPP-X (D/E)(D/E) e o EVH2 é responsável por mediar a tetramerização das Ena/VASP através de um motivo *coiled-coil* e se ligar tanto a actina G quanto à actina F (KRAUSE *et al.*, 2003).

À partir de buscas em bancos de dados de possíveis proteínas ligadoras do domínio EVH1 das proteínas Ena/VASP, KRAUSE *et al.* (2004) identificaram o cDNA de *KIAA1681* (NAGASE *et al.*, 2000) como possuidor da sequência rica em prolina e seu sítio de ligação (FPPPP-X) e nomearam a proteína de Lamelipodina (Lpd) por estar localizada nas pontas dos lamelipódios e filopódios juntamente com as proteínas Ena/VASP.

Os seis domínios de ligação à EVH1 (separados em quatro grupos) de Ena/VASP da Lpd estão localizados na extremidade C terminal, rica em prolina, juntamente com oito potenciais sítios de ligação aos domínios SH3, e três potenciais sítios de ligação à proteína Profilina (Figura 4). O domínio PH da Lpd se liga especificamente ao sinalizador celular $PI(3,4)P_2$, produto da cinase PI3K (KRAUSE *et al.*, 2004). Apesar de $PI(3,4)P_2$ ter seus níveis regulados por sinais extracelulares e sua distribuição ser preferencial à membrana plasmática e nuclear, o seu papel específico na motilidade celular ainda é incerto (LEGG e MACHESKY, 2004).

Os domínios RA são conhecidos por terem diferentes especificidades para GTPases (VICIANA *et al.*, 2004) e ainda não se sabe ao certo qual GTPase está fisiologicamente associada com a Lpd e como esta ligação afeta suas atividades celulares (LEGG e MACHESKY, 2004).

```

MEQLSDEEID HGAEEDSDKE DQDLDKMFGA WLGELDKLTQ SLDSDKPMEP 50
VKRSPLRQET NMANFSYRFS IYNLNEALNQ GETVDLDALM ADLCSIEQEL 100
SSIGSGNSKR QITETKATQK LPVSRHTLKH GTLKGLSSSS NRIAKPSHAS 150
YSLDDVTAQL EQASLSMDEA AQQSVLEDTK PLVTNQHRRT ASAGTVSDAE 200
VHSISNSSHS SITSAASSMD SLDIDKVTRP QELDLTHQGQ PITBEEQAAK 250
LKAEKIRVAL EKIKEAQVKK LVIRVHMSDD SSKTMMVDER QTVRQVLDNL 300
MDKSHCGYSL DWSLVETVSE LQMERIFEDH ENLVENLLNW TRDSQNKLIF 350
MERIEKYALF KNPQNYLLGK KETAEMADRN KEVLLEECFC GSSVTVPEIE 400
GVLWLKDDGK KSWKKRYFLL RASGIYYVVK GKAKVSRDLV CFLQLDHVNV 450
YYGQDYRNKY KAPTDYCLVL KHPQIQKKSQ YIKYLCDDDV RTLHQWVNGI 500
RIAKYGKQLY MNYQEALKRT BSAYDWTSL SSSI KSGSSS SSIPESQSNH 550
SNQSDSGVSD TQPAGHVRSQ SIVSSVFSEA WKRGTQLEES SKARMESMNR 600
PYTSLVPPLS POKIVTPYT ASQ PSPLPP PPPPPPPPP PPPPPPPLP 650
SQSAPSAGSA APMFVKYSTI TRLQNASQHS GALFKPPTPP VMQSQSVKPO 700
ILVPPNGVMP PPPPPPPPPT HGSAMAQLKP APCAPSLPOF SAPPPPLKIH 750
QVQHITQVAP PTPPPPPIP APLE PQAPPK PLVTIPAPTS TKTVAPVVTQ 800
AAPPTPTPV PPAKKQPAFP ASYIPSPPT PVVPVPPPTL PKQOSFCAKP 850
PPSPLSPVPS VVKQIASQFP PPPTPPAMES QPLKPVPANV APQSPPAVKA 900
KPKWQPSSIP VPSPDFPPP PESSLVFPPP PPSPVPAPP PPPPTASPTP 950
DKSGSPGKKT SKTSSPGGKK PPPTPQRNSS IKSSSGAHP EPKRPSVDSL 1000
VSKFTPPAES GSPSKETLPP PAAPPKPGKL NLSGVNLPV LQGCVSAKA 1050
PVLSGRGKDS VVEFPSPSD SDFPPPPPET DLPLPIEIP AVFSGNTSPK 1100
VAVVNPQPQQ WSKMSVKKAP PPTRPKRND S TRLTQAEISE OPTMATVVPQ 1150
VPTSPKSSLS VQPGFLADLN RTLQRKSITR HGSLSSRMSR AEPTATMDDM 1200
ALPPPPPELL SDQOKAGYGG SHISGYATLR RGPPPAPPK DQNTKLSRDW 1250

```

FIGURA 4 – SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA LAMELIPODINA. FONTE: KRAUSE *et al.*, (2004). LEGENDA: O domínio RA (sublinhado), o domínio PH (negrito), os oito sítios de ligação a SH3 (negrito e itálico), os três sítios de ligação à Profilina (nas caixas) e os quatro grupos contendo seis sítios de ligação à EVH1 das Ena/VASP (negrito e sublinhado) são mostrados.

2.2.2 Funções e interações

A locomoção celular resulta da coordenação dos movimentos gerados por diferentes partes de uma célula. A migração é iniciada pela formação de uma grande e larga protrusão de membrana celular na direção do movimento, com a principal característica sendo a polimerização da proteína actina que se interconecta para a formação de filamentos e redes em uma direção de protrusão, denominada lamelipódio. Em alguns casos, projeções delgadas da membrana em formato de dedos, chamadas de filopódios, também são estendidas da margem de direção (LODISH *et al.*, 2005).

A migração celular direcionada é essencial para o desenvolvimento e a fisiologia dos organismos, além de estar diretamente envolvida em certas patologias. Processos como quimiotaxia de linfócitos, direcionamento de axônios, angiogênese e metástase de células tumorais requerem mudanças na motilidade em resposta a sinais ambientais (SERVANT *et al.*, 1999; YAMAZAKI *et al.*, 2005) e mudanças na dinâmica da actina são induzidas por uma variedade de proteínas associadas à actina incluindo as proteínas da família Ena/VASP em associação com diversas proteínas, entre elas a Lpd.

KRAUSE *et al.* (2004) verificaram que a Lpd quando superexpressa aumenta a velocidade da protrusão lamelipodial, um efeito observado também quando proteínas Ena/VASP são superexpressas. Quando a expressão da Lpd é suprimida a formação do lamelipódio é prejudicada assim como podem ser observadas uma redução na velocidade de protrusão lamelipodial e uma diminuição de actina F. Tais fenótipos são mais severos do que os observados com somente a perda das proteínas Ena/VASP, sugerindo que a Lpd é responsável pela regulação de outros efetores do citoesqueleto de actina, além de cooperar com as proteínas Ena/VASP na transdução de sinais.

Foi sugerido no mesmo trabalho de KRAUSE *et al.* (2004) que a Lpd poderia atuar como um meio de ligação entre sinais assimétricos a jusante de receptores de quimiotaxia e proteínas Ena/VASP, assim como de outros reguladores da polimerização da actina, por ser ligante tanto de PI(3,4)P₂, presente na membrana celular, quanto das proteínas Ena/VASP.

MIG-10 (ortólogo da Lpd encontrada em *C. elegans*) é uma proteína adaptadora citoplasmática que tem sido relacionada a migrações neuronais antero-posteriores (MANSER *et al.*, 1990; MANSER *et al.*, 1997; CHANG *et al.*, 2006). Resultados obtidos por QUINN *et al.* (2006) indicam que MIG-10/RIAM/lamelipodina funcionam a jusante das moléculas UNC-6/netrin e SLT-1/slit, guiando de maneira atrativa e repulsiva

(respectivamente) a migração ventral dos axônios AVM e PVM em *C. elegans*. Além disso, a superexpressão de MIG-10, na ausência de UNC-6 e SLT-1, induz um fenótipo multipolar com crescimento axonal sem direção definida. No entanto, a adição de UNC-6 ou SLT-1 tornam os neurônios monopolares, sugerindo que as moléculas UNC-6 e SLT-1 têm a habilidade de direcionar o crescimento dos axônios AVM e PVM mediado pela MIG-10.

CED-10 é uma GTPase ortóloga da Rac1, envolvida no direcionamento dos axônios (KAUFMANN *et al.*, 1998; LUNDQUIST *et al.*, 2001; NG *et al.*, 2002). Resultados obtidos por QUINN *et al.* (2008) indicam que CED-10/Rac1 ativa é responsável por se ligar e causar a localização assimétrica de MIG-10/Lamelipodina e também de actina-F e microtúbulos em *C. elegans*, induzindo a montagem do citoesqueleto e por consequência crescimento polarizado dos axônios em resposta a UNC-6/netrin.

Resultados encontrados por MICHAEL *et al.* (2010) sugerem que a Lpd é um substrato das cinases Abl e que a Lpd se liga ao seu domínio SH2. A fosforilação da Lpd regula positivamente sua interação com as proteínas Ena/VASP. Dessa forma, o recrutamento eficiente de Mena e EVL pela Lpd depende das cinases ABL para a formação dos lamelipódios. Tanto a tirosina-cinase Abl quanto as proteínas Ena/VASP atuam a jusante da molécula netrin-1 no direcionamento dos axônios via receptor DCC regulando a motilidade celular (KRAUSE *et al.*, 2003; PULA *et al.*, 2008; DREES *et al.*, 2008; BRADLEY *et al.*, 2009) e a proteína Lpd foi proposta como sendo o intermediário, até então desconhecido, entre as cinases Abl e as proteínas Ena/VASP neste processo.

Também foi proposto por MICHAEL *et al.* (2010) que a Lpd e as proteínas Ena/VASP regulam a ondulação dorsal de fibroblastos sob tratamento com o fator de crescimento PDGF e que a função da Lpd neste processo é também controlada pelas cinases Abl mediada pelas proteínas Ena/VASP, e que tanto a Lpd quanto c-Abl cooperam durante a morfogênese axonal de uma maneira dependente de Ena/VASP.

LI *et al.* (2008) verificaram a existência de fragmentos derivados da Lpd em tetrâmeros da Butirilcolinesterase humana (BChE) e de cavalos. Estes peptídeos estão presentes tanto na BChE sérica como também na BChE da junção neuromuscular e do sistema nervoso central. Os fragmentos ricos em prolina da Lpd encontrados, além de dirigirem a formação dos tetrâmeros, fazem parte do complexo final e permanecem intrínsecos organizando suas quatro subunidades.

Resultados obtidos por LYULCHEVA *et al.* (2008) sugerem que um ortólogo da Lamelipodina humana encontrado em *Drosophila* (chamado "pico"), é importante para a proliferação celular e o crescimento dos tecidos e do organismo de forma geral. Redução

nos níveis da proteína pico ocasionam redução nas taxas de divisão celular, retardo no crescimento, aumento na proporção de actina G em relação a F e letalidade, enquanto que sua superexpressão resulta em uma diminuição da proporção de actina G em relação a F e crescimento acentuado dos tecidos de uma maneira dependente de EGF (fator de crescimento epidermal). Em células HeLa a Lpd foi requerida para a indução de proliferação dependente de EGF, evidenciando que o efeito da proteína pico na proliferação é conservado na Lpd humana.

SRF (*serum response factor*) é um fator de transcrição responsivo a mitógenos envolvido no crescimento de tecidos e inibido por ligação da actina-G celular ao seu cofator Mal (POSEM e TREISMAN, 2006). As proteínas Ena/VASP podem induzir a atividade da SRF por uma região que medeia a formação de actina-F (SOTIROPOULUS *et al.*, 1999; GROSSE *et al.*, 2003). LYULCHEVA *et al.* (2008) demonstraram que tanto a proteína pico quanto a Lpd também possuem a habilidade de ativar uma resposta do fator de transcrição SRF pela sua interação às proteínas Ena/VASP, sugerindo que as proteínas MRL também estão envolvidas na via de sinalização *mal*/SRF no crescimento de tecidos e proliferação celular.

2.3 CÂNCER

O câncer se constitui de um conjunto de mais de 100 doenças normalmente decorrentes de falhas nos mecanismos que controlam o crescimento e a proliferação celular. As alterações que propiciam a oncogênese modificam várias propriedades fundamentais das células, permitindo que elas escapem aos controles normais de crescimento, e finalmente, exibam o fenótipo de uma célula neoplásica (LODISH *et al.*, 2005).

Dividindo-se de forma rápida e descontrolada, as células neoplásicas formam tumores (termo genérico utilizado para indicar um aumento anormal de uma parte ou da totalidade de um tecido), que podem ser classificados como benignos ou malignos (NUSSBAUM *et al.*, 2001). Aqueles que crescem localizados, sem invasão a tecidos subjacentes são classificados como tumores benignos, enquanto aqueles capazes de invadir tecidos próximos e se disseminarem pelo corpo (metástases) são chamados de tumores malignos, ou câncer (WEINBERG, 2008).

A transformação de células normais em células tumorais envolve um conjunto de alterações genéticas e/ ou epigenéticas em genes importantes no controle da homeostasia celular, somadas as interações aberrantes com o microambiente. Os principais genes envolvidos neste processo são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Estes genes regulam direta ou indiretamente os mecanismos celulares de controle de proliferação, morte celular e integridade genômica (HUNT *et al.*, 2001; KVITKO, 2003).

Os proto-oncogenes são genes extremamente conservados na evolução das espécies e seus produtos regulam o crescimento e diferenciação celular nos eucariotos. Estão localizados em diversos sítios do DNA e seus produtos são responsáveis por regular a cascata de eventos que mantém a progressão ordenada do ciclo celular, divisão e diferenciação celular (LOURO *et al.*, 2002). Quando mutado, um proto-oncogene se transforma em um oncogene, ocorrendo a perda do seu controle normal na regulação do crescimento, o que contribui para o aumento de certos produtos protéicos, desregulação da divisão celular e o consequente fenótipo maligno da célula (SUGIMURA, 1998 *apud* OLIVEIRA, 2008).

O termo amplificação gênica se refere a um aumento seletivo do número de cópias de determinado gene e normalmente resulta em um aumento do produto do gene amplificado. A amplificação é um dos mecanismos que permite a expressão em quantidades elevadas que excederia a capacidade de transcrição de uma única cópia do gene. A amplificação de oncogenes é conhecida por exercer um papel fundamental no desenvolvimento de tumores sólidos em humanos e ao mesmo tempo reflete a instabilidade genética de células tumorais (SCHWAB, 1999).

Os genes supressores de tumor por sua vez, atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte programada por apoptose, reduzindo a probabilidade de que um tumor clinicamente detectável venha a aparecer em algum tecido do corpo (WEINBERG, 2008). Alterações que inativam estes genes liberam a célula da inibição regulada em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando à proliferação desordenada, característica da célula neoplásica (WEINBERG, 1991).

Alterações nos genes supressores de tumor determinam a perda de função, e por estas alterações serem consideradas recessivas ao nível celular a função destes genes somente é perdida quando ambos os alelos são inativados (BIÈCHE *et al.*, 1993 *apud* OLIVEIRA, 2008). Conforme o modelo de Knudson para o gene do retinoblastoma (*RB1*) (KNUDSON, 1971 *apud* OLIVEIRA, 2009), o primeiro alelo geralmente é inativado por uma

mutação gênica (somática ou germinativa), e o segundo por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene está localizado ou então por mecanismos epigenéticos. Genes que antes da progressão tumoral se encontravam em heterozigose podem sofrer uma redução, alcançando a perda alélica total. Este mecanismo é conhecido como perda de heterozigose (*Loss of Heterozygosity* - LOH) (WEINBERG, 1991). Deleções cromossômicas parecem ser as primeiras assim como as mais frequentes mutações somáticas que ocorrem durante a carcinogênese (DONG, 2001).

Durante a formação do tumor, seis propriedades celulares fundamentais relacionadas aos proto-oncogenes e genes supressores de tumor normalmente estão alteradas (Figura 5): as células se tornam auto-suficientes em sinais de crescimento e insensíveis aos sinais de anti-crescimento; tornam-se capazes de driblar o processo de morte celular programada (evasão da apoptose); adquirem um potencial de replicação ilimitado; promovem angiogênese contínua ao redor da massa em crescimento e, no caso dos tumores malignos, adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e provocarem metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Os tumores menos agressivos podem apresentar apenas algumas destas características (LODISH *et al.*, 2005).

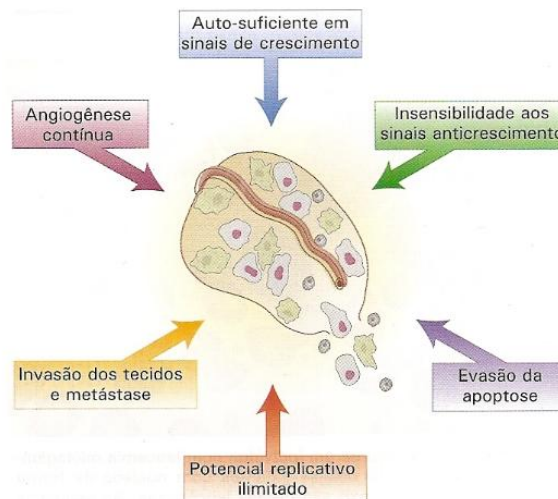


FIGURA 5 – ALTERAÇÕES CELULARES ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER. FONTE: LODISH *et al.*, (2005) ADAPTADA DE HANAHAN E WEINBERG, (2000).

Os tumores malignos primários são responsáveis fundamentalmente por apenas 10% das mortes por câncer. Os 90% restantes de pacientes apresentam crescimentos neoplásicos em locais distantes do tumor primário. Essas metástases são formadas por células que migraram da massa tumoral primária e por meio do sangue e vasos linfáticos estabeleceram novas colônias em novos locais. Tais células (móveis/migratórias) são as manifestações mais agressivas do processo de câncer (WEINBERG, 2008).

Os tipos mais prevalentes de câncer são derivados de populações de células que se dividem ativamente, entre elas as células epiteliais nos intestinos, nos pulmões ou na glândula prostática, e são denominados carcinomas. Esses tumores são responsáveis por mais de 80% dos óbitos relacionados ao câncer no mundo ocidental. As formas mais raras desenvolvem-se de populações celulares que tipicamente não se dividem, por exemplo, as células musculares ou nervosas. Estas células originam os sarcomas (que se desenvolvem tipicamente de células do tecido conjuntivo), e os gliomas (células do sistema nervoso central e periférico), além de já terem sido descritos diversos outros tipos de cânceres que se originam a partir de outros tipos celulares e que não se enquadram nestes grandes grupos (SNUSTAD e SIMMONS, 2008; WEINBERG, 2008).

Além dos fatores genéticos, existe uma série de outros fatores considerados de risco associados ao desenvolvimento de cânceres, entre eles: idade avançada, dieta, exposição à radiação ou outros agentes físicos, agentes químicos, infecções por agentes patogênicos, entre outros (COOPER, 1994).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/ OMS (*World Cancer Report, 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2009).

2.4 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença que acomete o tecido mamário, na qual células epiteliais e estromais colaboram para gerar a malignidade (TLSTY *et al.*, 2004). A doença tem início quando células, na maioria dos casos, dos lóbulos ou ductos, por alguma razão ainda não totalmente esclarecida, começam a se dividir de forma anormal e incontrolável, e formam uma massa de tecido independente, o tumor (DeFELICE, 2002).

Existem muitos tipos de carcinomas mamários classificados de acordo com sua histologia. A maioria, aproximadamente 90%, surge nos ductos (Figura 6) e são chamados de Carcinomas Ductais. O mais comum dentre estes é chamado de Carcinoma Ductal Invasor (CDI). Seu diagnóstico é feito por exclusão quando a lesão não preenche os critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinomas mamários, sendo classificado como carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação (SOE). Outros tipos de carcinomas mamários menos frequentes são os medulares, tubulares e mucinosos. O carcinoma lobular, característico por acometer os lóbulos do tecido mamário, é responsável por quase 5% dos casos câncer de mama (COOPER, 1992).

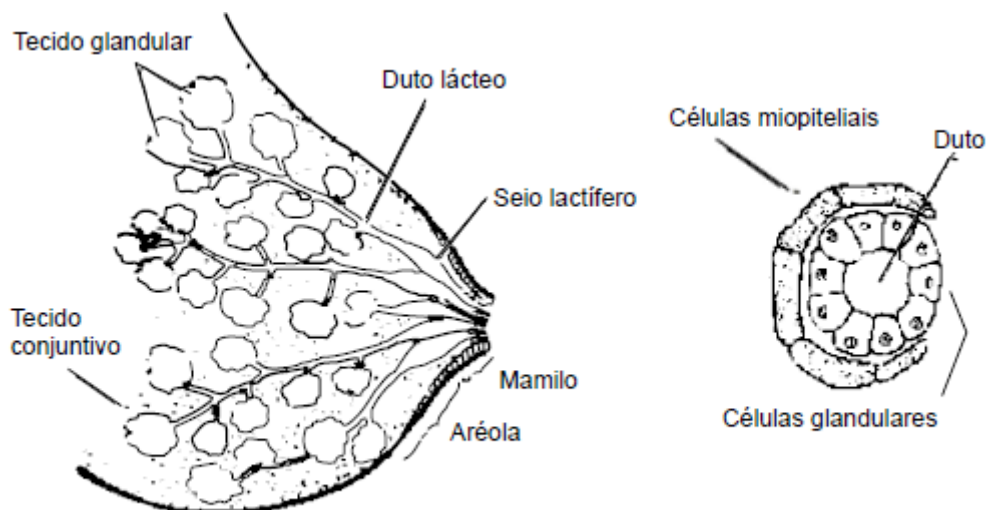


FIGURA 6 – ANATOMIA DA MAMA FEMININA. FONTE: ADAPTADO DE MATUHARA E NAGANUMA (2006).

O câncer de mama considerado esporádico, ou seja, sem associação com o fator hereditário, representa mais de 90% dos casos de câncer de mama em todo mundo. Dados clínicos, epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que o risco de desenvolvimento de câncer de mama esporádico está fortemente relacionado à produção de esteróides sexuais. Condições endócrinas moduladas pela função ovariana, como a menarca precoce, menopausa tardia e gestação, assim como a utilização de estrógenos exógenos, são componentes relevantes do risco de desenvolvimento do câncer de mama (MACMAHON *et al.*, 1970; LAMBE *et al.*, 1996; GREENLEE *et al.*, 2000). Em sinergismo com os fatores hormonais, estudos observacionais indicam que o comportamento humano relacionado ao estilo de vida, o que inclui modificações na dieta e na atividade física, podem contribuir para o aumento da incidência do câncer de mama em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2004).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%, sendo que para países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%, já nos países em desenvolvimento fica em 57% (INCA/MS, 2009).

No Brasil, o câncer de mama é o segundo maior responsável pela mortalidade feminina (ZAGO *et al.*, 2005). De acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2012 e 2013 (INCA/MS, 2011), o número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2012 é de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 novos casos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). Na Região Norte é o segundo tumor mais incidente (17/100.000). Nos Estados Unidos, calculou-se o surgimento de 207.090 novos casos de câncer de mama invasivo entre as mulheres, e 1.970 novos casos entre os homens, durante o ano de 2010 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

A quantificação dos receptores hormonais – receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) – é uma estratégia fundamental para estabelecer o tratamento adequado a mulheres com câncer de mama. Sabe-se que cerca de 70% dos tumores de mama expressam esses receptores variando de acordo com a idade, sendo mais frequente

em mulheres após a menopausa. Deste modo, a presença de RE e RP é um importante fator preditivo para a probabilidade de resposta à terapia endócrina com tamoxifeno (PRITCHARD, 2000; WINNER *et al.*, 2001). O tamoxifeno se liga ao receptor de estrogênio e forma um complexo capaz de atenuar a transcrição de determinados genes, resultando no bloqueio da fase G₁ do ciclo celular. Este bloqueio é responsável por um retardo na proliferação das células tumorais (CLEMONS *et al.*, 2002).

O Gene *HER2* está amplificado ou superexpresso em 25% a 30% dos carcinomas mamários representando um pior prognóstico para as pacientes, como por exemplo, tumores indiferenciados (grau III), presença de metástase nos linfonodos axilares e diminuição da expressão dos receptores hormonais, além de um potencial aumentado de metástases. Todas estas características estão associadas a um maior risco de recorrência da doença e também de morte (SLAMON *et al.*, 1987; SLAMON, 1990). Quando o receptor HER-2/*neu* se encontra superexpresso nas células tumorais, o tratamento com anticorpos monoclonais humanizados trastuzumab (Herceptin, Roche Biomedical Laboratories) aumenta a expectativa de vida das pacientes, uma vez que a ligação do anticorpo com o receptor inibe a proliferação dos tumores em crescimento (BASELGA *et al.*, 1996; SLAMON *et al.*, 1998; PEGRAM *et al.*, 1998).

Os genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* são considerados genes de manutenção (OLDENBURG *et al.*, 2007), pois suas funções estão ligadas a processos metabólicos chaves para o organismo, como reparo de danos no DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular (VENKITARAMAN, 2002; CIPOLLINI *et al.*, 2004). Estima-se que 5 a 10% dos casos de câncer de mama sejam hereditários e atribuídos a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Mutações no *BRCA1* são associadas com o câncer familiar de mama e ovário, enquanto mutações no *BRCA2* são associadas fortemente com o câncer de mama masculino (HONRADO *et al.*, 2005). Estimativas iniciais indicavam que os genes *BRCA1* e 2 seriam responsáveis por 75% dos casos de câncer de mama em famílias com múltiplos casos, entretanto dados posteriores sugeriram que estas estimativas poderiam estar superestimadas. Mutações nestes genes foram encontradas em 45% das famílias com tumores de mama e ovário, enquanto que a frequência de mutações em famílias com casos apenas de câncer de mama foram menores, variando de 15% a 35% (FORD *et al.*, 1995). A penetrância dessas mutações é incompleta e depende de diferentes fatores como, tipos da mutação, população e/ou fatores exógenos. Em geral, mutações nas linhagens germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* conferem risco de câncer de 80% em pessoas com idade de 70 anos ou mais (EASTON *et al.*, 1994).

Mutações germinativas nos genes *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHECK2* (genes supressores de tumor que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular e/ou com funções no reparo do DNA) e *HMMR* (interage com o *BRCA1* aumentando a instabilidade genética e interferindo no ciclo celular) também estão associadas ao carcinoma de mama hereditário (BOGLIOLO, 2006; PUJANA *et al.*, 2007).

2.5 CÂNCER, GENE *RAPH1* E LAMELIPODINA

A região onde está localizado o gene *RAPH1* (2q33) está comumente deletada em diversos tipos de cânceres, entre eles: carcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de boca, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células escamosa do esôfago, neuroblastoma e câncer de pulmão (OTSUKA *et al.*, 1996; PACK *et al.*, 1999; TAKITA *et al.*, 2001; BEDER *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2003). Além disto, trabalhos sugerem que o gene *RAPH1* possa estar sendo expresso de maneira diferente em cânceres quando comparado a tecidos normais (DAHL *et al.*, 2005; EPPERT *et al.*, 2005).

EPPERT *et al.* (2005) analisaram a expressão de aproximadamente 950 genes com o intuito de selecionar aqueles que apresentassem um padrão diferente de expressão entre osteossarcomas primários e metastáticos, a fim de analisar genes envolvidos na progressão do câncer. O gene *RAPH1*, chamado pelo autor de *RMO1* (*reduced expression in metastatic osteosarcoma*), foi isolado baseado na baixa expressão em amostras metastáticas quando comparadas com sua correspondente amostra de osteossarcoma primário (mesmo paciente), 6 de 7 amostras pareadas apresentaram menor expressão do gene ($p = 0,034$ teste-*t*). No mesmo trabalho também foi verificada uma frequência de Perda de Heterozigose (LOH) de 6 em 9 amostras (67%) em tumores primários, indicando um possível papel do gene também no desenvolvimento de osteossarcomas primários.

A diminuição da expressão foi observada mais comumente durante a progressão de tumores primários para metastáticos (analisadas do mesmo paciente) enquanto que a LOH foi mais evidente somente em tumores primários. Estes fatos sugerem que os dois eventos estão separadamente envolvidos no câncer e que a LOH não é responsável pela diminuição da expressão em osteossarcomas, sendo a causa desta diminuição não determinada pelo autor. Tanto a LOH quanto a diminuição da expressão gênica indicam

que o gene *RAPH1* pode estar potencialmente envolvido tanto no desenvolvimento quanto na progressão de osteossarcomas.

DAHL *et al.* (2005) identificaram vinte e nove genes que se apresentavam diferentemente expressos em cânceres de ovário e mama quando comparados com tecido normal. Entre estes genes estava o gene *RAPH1*, que se apresentou menos expresso em 25% das amostras de cânceres de ovário e em 43% da amostra de câncer de mama, quando comparado com amostras de tecido normal.

A proteína Profilina (Pfn1) também regula a dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina promovendo uma eficiente troca de ADP para ATP na actina G e adicionando ATP às actinas G criadas às pontas dos filamentos para que ocorra a polimerização (WITKE, 2004). Resultados obtidos por BAE *et al.* (2009) mostraram que quando a proteína Pfn1 está silenciada ocorre a formação de lamelipódios mais lentos porém estáveis; aumento na taxa de protrusão lamelipodial e aumento da motilidade de maneira geral em células MDA-MB-231 de linhagem celular de câncer de mama. A perda da Pfn1 leva a um aumento do recrutamento das proteínas VASP na membrana celular, envolvendo a proteína Lpd. Tanto a Pfn1 quanto a Lpd podem se ligar aos domínios PI(3,4)P₂ da membrana celular, competindo por este sítio. Na ausência da Pfn1 a Lpd está livre para atuar nestes sítios juntamente com a proteína VASP (uma vez que o recrutamento desta é feita pela Lpd) causando um aumento na motilidade celular (BAE *et al.*, 2010).

Coletivamente, os dados encontrados na literatura sugerem que a Lpd (assim como as demais proteínas da família MRL) podem desempenhar um importante papel na patogênese de determinados cânceres e podem representar novos alvos moleculares para a intervenção terapêutica (LYULCHEVA *et al.*, 2008) principalmente nas vias que acarretam em aumento da motilidade celular e metástase.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Verificar se há alteração estrutural do gene *RAPH1*, responsável por codificar a proteína Lamelipodina, em tumores mamários.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar se existe amplificação ou deleção do gene *RAPH1* em tecido mamário tumoral em relação ao tecido normal, utilizando a técnica PCR em tempo real.
- Correlacionar os resultados encontrados com os parâmetros clínico-histopatológicos das pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Amostra

Foram utilizados fragmentos de tumores de mama juntamente com amostras de sangue periférico (utilizadas como controle) já coletadas e gentilmente cedidas pela equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, de 52 pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba, Paraná, totalizando 104 amostras. As informações clínico - histopatológicas das pacientes estão descritas na Tabela 1. Em algumas características a informação era inexistente para certas pacientes e dessa forma foram agrupadas em “SI” (Sem Informação); os tipos histológicos que não se incluíam em Carcinomas Ductais, Lobulares e Tubulares foram classificados na categoria “Outros”.

TABELA 1 – INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES.

(continua)

<u>Idade Menarca</u>	<u>Ocorrência</u>	<u>%</u>	<u>Idade 1ª Gravidez</u>	<u>Ocorrências</u>	<u>%</u>
SI	39	75%	SI	43	83%
10-11	3	6%	17-21	3	6%
12-13	8	15%	22-26	2	4%
14-15	2	4%	27-32	4	8%
Total	52	100%	Total	52	100%

<u>Número de filhos</u>	<u>Ocorrências</u>	<u>%</u>	<u>Idade da Paciente</u>	<u>Ocorrências</u>	<u>%</u>
SI	36	69%	SI	8	15%
1	3	6%	30-44	8	15%
2	4	8%	45-59	17	33%
3	4	8%	60-74	14	27%
4	1	2%	75-89	4	8%
9	1	2%	90-104	1	2%
0	3	6%	Total	52	100%
Total	52	100%			

<u>Gene HER2 Amplificado</u>	<u>Ocorrências</u>	<u>%</u>	<u>Metástase nos Linfonodos</u>	<u>Ocorrências</u>	<u>%</u>
SI	18	35%	SI	10	19%
Não	29	56%	Ausente	24	46%
Sim	5	10%	Presente	18	35%
Total	52	100%	Total	52	100%

TABELA 1 – INFORMAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES.

(conclusão)

Patologia	Ocorrências	%
SI	4	8%
Ductal ^a	39	75%
Lobular ^b	2	4%
Tubular ^c	2	4%
Outros ^d	5	10%
Total	52	100%

Fumante	Ocorrências	%
SI	45	87%
Não	3	6%
Sim	4	8%
Total	52	100%

Idade Menopausa	Ocorrências	%
SI	43	83%
45-49	3	6%
50-55	6	12%
Total	52	100%

Grau do Tumor	Ocorrências	%
SI	9	17%
I	7	13%
II	26	50%
III	10	19%
Total	52	100%

Pílula	Ocorrências	%
SI	46	88%
Não	3	5,8%
Sim	3	5,8%
Total	52	100%

Tamanho do Tumor (mm)	Ocorrências	%
SI	11	21%
5-24	15	29%
25-44	19	37%
45-64	4	8%
65-84	3	6%
Total	52	100%

Receptor de Estrogênio	Ocorrências	%
SI	18	35%
Ausente	5	10%
Presente	29	56%
Total	52	100%

Receptor de Progesterona	Ocorrências	%
SI	19	37%
Ausente	6	12%
Presente	27	52%
Total	52	100%

^aCarcinoma Ductal^b Carcinoma Lobular^c Carcinoma Tubular^d Outros tipos histológicos de Carcinoma de Mama**SI** – Sem Informação**I-** Bem diferenciado e crescimento lento**II-** Moderadamente diferenciado**III-** Indiferenciado e com alta proliferação

FONTE: O AUTOR (2012)

4.2 Coleta e Armazenamento das Amostras

Foram coletados cerca de 10 ml de sangue periférico de cada paciente, por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. O material foi imediatamente colocado em tubos estéreis contendo 1,75 ml de solução anti-coagulante-ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR, onde foram mantidos a 4° C até o momento do processamento.

Já as amostras do tecido tumoral foram removidas cirurgicamente, avaliadas por um patologista para a confirmação da malignidade e devidamente acondicionadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C) para posterior extração do DNA no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da UFPR.

A classificação histopatológica foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela classificação internacional de tumores (WHO) e o estadiamento clínico foi determinado de acordo com o estadiamento TNM do câncer.

4.3 Extração do DNA Sanguíneo

O DNA do sangue periférico foi extraído pelo método *salting out*, segundo Bignon & Fernandez-Viña (1997), com modificações. Esta técnica permite a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e precipitação do DNA com etanol.

Cerca de 10 ml de sangue periférico foram centrifugados com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10 X concentrada: 12,1 g de Tris, 110,2 g de MgCl₂, 5,8 g de NaCl) a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo foi repetido até a obtenção de um botão de glóbulos brancos que foi incubado a 60° C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5 X (Invitrogen), 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultrapura.

Em seguida, foram adicionados 100 µl de solução saturada de NaCl (6M) para a precipitação protéica, aproveitando-se somente o sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, foi realizada a precipitação do DNA com a adição de 700 µl de etanol. Ao final do processo a amostra de DNA foi ressuspensa em 50 µl de água ultra-pura e armazenada a -20° C até o momento da amplificação por PCR.

4.4 Extração de DNA do Tecido Tumoral

Após ser descongelado, o tecido tumoral foi fragmentado com o auxílio de tesouras, pinças e bisturis estéreis. Para a obtenção de DNA de alto peso molecular, seguiu-se o protocolo de extração manual pelo método de Fenol-Clorofórmio.

Os fragmentos do tecido tumoral foram colocados em um tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 80 µL de tampão da proteinase K 5 X, 40 µL de proteinase K (10 mg/mL), 20 µL de Sulfato Dodecil de Sódio (SDS) 20% e 240 µL de água ultra-pura, e esse conjunto foi homogeneizado em agitador tipo Vortex. Em seguida, o tubo foi incubado no bloco de aquecimento a 60°C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Na sequência, foram adicionados 500 µL de fenol saturado pH 8,0 e 400 µL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O tubo, então, foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados a ele 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto para a precipitação do DNA. Em caso de precipitação de pouco DNA, a amostra foi incubada a -20°C por uma hora. Esse novo tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Logo após, foram adicionados 500 µL de etanol 70% e o tubo foi invertido gentilmente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo foi colocado em bloco de aquecimento a 55°C por 10 minutos para que o DNA secasse.

A amostra de DNA foi então ressuspensa em 30 a 50 µL de água ultra-pura e retornou ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos, para que a solução de DNA ficasse homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20°C.

4.5 Quantificação do gene *RAPH1* por PCR em Tempo Real (qPCR)

A técnica PCR em Tempo Real é baseada no método clássico de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) desenvolvido por Kary Mullis na década de 80 que permitiu aos pesquisadores amplificar regiões específicas de DNA em mais de 1 um bilhão de cópias. (MULLIS; FALOONA, 1987; MULLIS, 1990; SAIKI *et al.*, 1985 *apud* VALASEK; REPA, 2005).

A PCR em Tempo Real, desde sua invenção na década de 90 (HIGUCHI *et al.*, 1992, 1993), tem sido amplamente utilizada com diversas finalidades, entre elas:

diagnóstico de doença e carga viral (HIV, Vírus da hepatite B, C e outros); eficácia da terapêutica de determinadas drogas; detecção de patógenos; quantificação gênica; genotipagem entre outras (INFORMATIVO BIESP, 2006).

A grande vantagem da PCR em Tempo Real quando comparada com a PCR convencional é a possibilidade da detecção dos resultados na primeira fase da reação de amplificação (fase exponencial), considerada mais precisa. Na PCR convencional existe a necessidade da utilização de géis de poliacrilamida ou agarose, que normalmente consomem muito tempo e nem sempre garantem um resultado preciso, além de os resultados só poderem ser observados na última fase da reação (Fase Platô) (Figura 7).

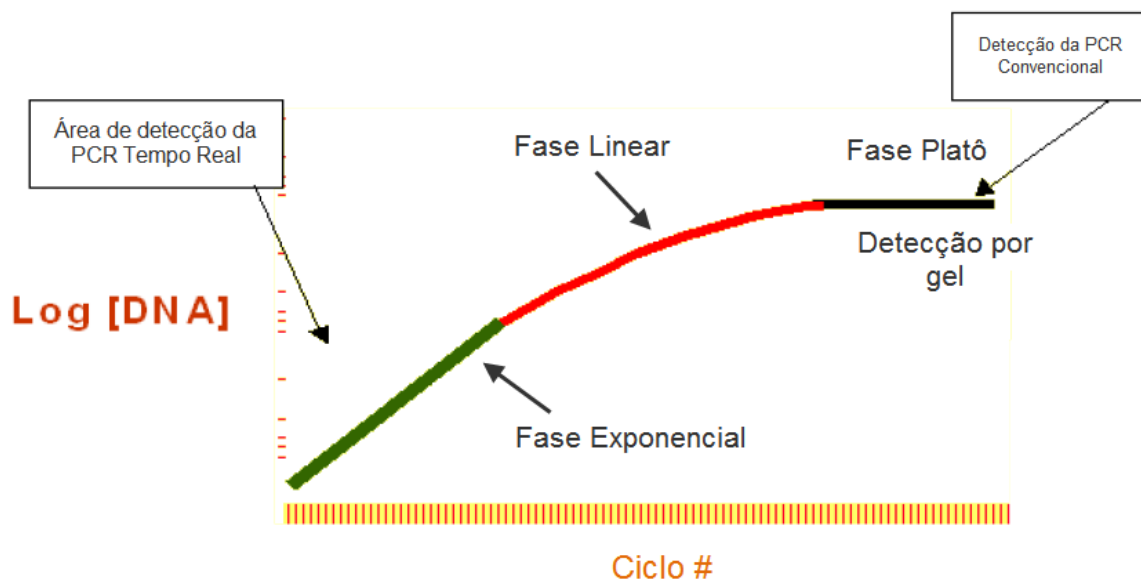


FIGURA 7 - FASES DA PCR EM ESCALA LOGARÍTMICA. FONTE: ADAPTADO DO TUTORIAL DA APPLIED BIOSYSTEMS (REAL-TIME PCR VS. TRADITIONAL PCR).

A técnica PCR em Tempo Real foi utilizada neste estudo para a análise da alteração do número de cópias do gene *RAPH1* utilizando-se DNA de amostras tumorais e seus respectivos controles de sangue periférico. A reação de amplificação foi realizada com o Master MIX *QuantiFast® Probe* PCR, que contém a enzima *HotStarTaq® Plus* DNA Polimerase com atividade *exo-nuclease 5'*, dNTPs e tampão específico para a reação de amplificação, também foram utilizados na reação iniciadores específicos e sondas fluorescentes. A atividade *exo-nuclease 5'* e as sondas *TaqMan®*, permitem a detecção da

reação de PCR em Tempo Real por emissão de fluorescência. As sondas são pequenos oligonucleotídios específicos para cada região a ser analisada e se hibridizam entre os dois iniciadores. Estas sondas contêm os fluoróforos Reporteres (extremidade 5') e Quencher (extremidade 3').

Durante a reação de amplificação a DNA Polimerase é responsável por clivar as sondas contendo os fluoróforos que estavam previamente ligadas às fitas de DNA (Figura 8). Ao ser liberado (Figura 9), o fluoróforo de maior energia, Reporter, consegue emitir sua fluorescência antes suprimida pelo fluoróforo de menor energia, o Quencher.

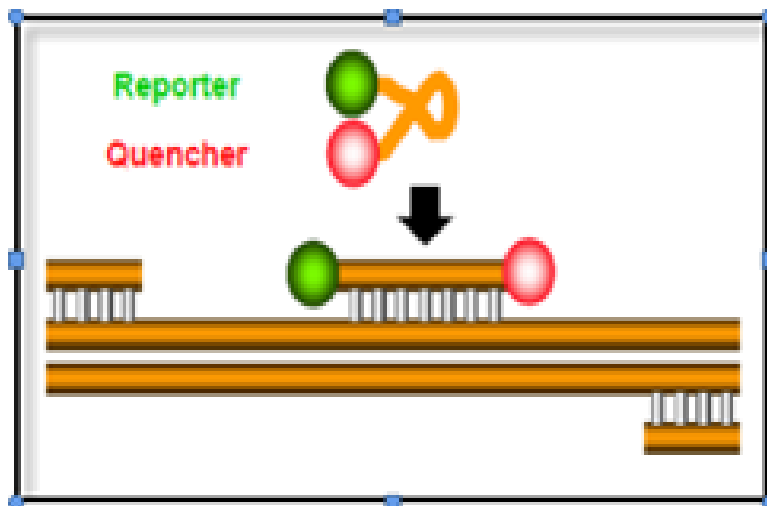


FIGURA 8– SONDA LIGADA A FITA DE DNA. FONTE: APPLIED BIOSYSTEMS (REAL-TIME PCR VS. TRADITIONAL PCR)

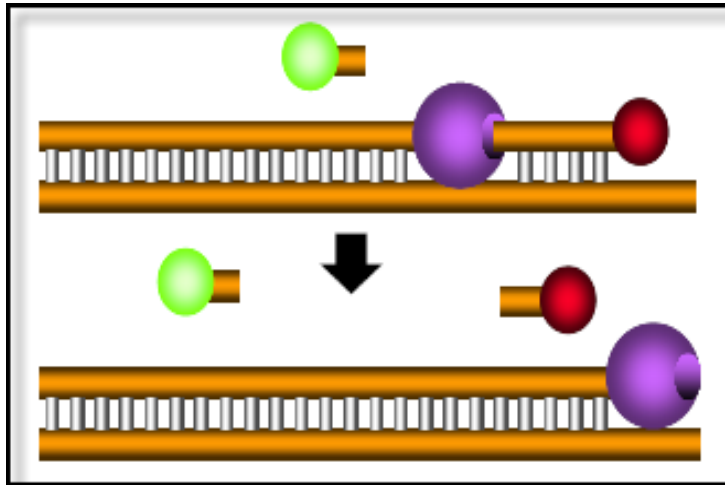


FIGURA 9 – LIBERAÇÃO DOS FLUORÓFOROS PELA POLIMERASE. FONTE: APPLIED BIOSYSTEMS (REAL-TIME PCR VS. TRADITIONAL PCR)

Quando o sinal de fluorescência (R_n) aumenta para um nível detectável, ele pode ser capturado por um instrumento de detecção e apresentado por um software apropriado na forma de uma Curva de Amplificação (Figura 10). A quantidade de sinal Reporter é proporcional à quantidade de produto sendo produzido pelas amostras.

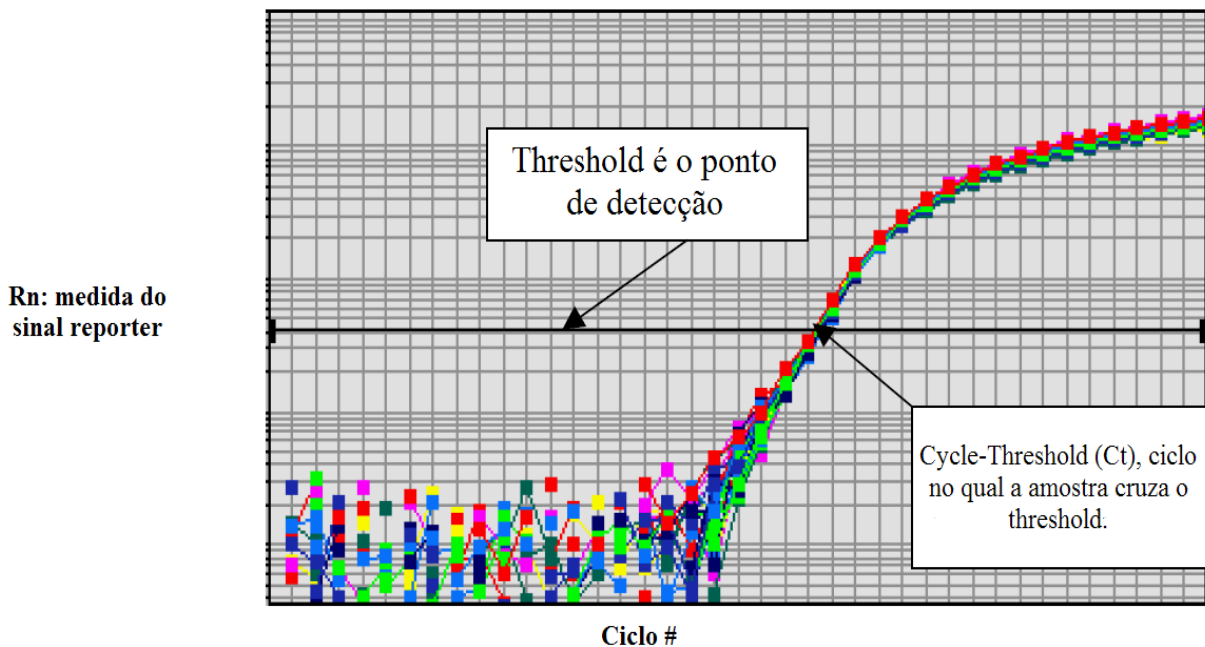


FIGURA 10 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO. FONTE: APPLIED BIOSYSTEMS (REAL-TIME PCR VS. TRADITIONAL PCR)

4.6 Análise pela Construção da Curva Padrão

A amplificação dos segmentos realizada pela PCR em tempo real foi analisada por meio da Quantificação Relativa, a qual determina a quantidade do gene alvo em relação a um ou mais controles internos (genes de referência). Os genes de referência escolhidos foram: Pumilio Homólogo 1 (*PUM1*) 18S e β -Actina (*ACTB*), por terem se mostrado pouco variáveis em estudos de qPCR em amostras de carcinomas mamários (MORSE *et al.*, 2005; LYNG *et al.*, 2008).

Os cálculos baseiam-se, indiretamente, na comparação dos CTs (*Cycle threshold*), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação exponencial alcança intensidade fluorescente superior ao limiar de detecção (*threshold*). Quanto maior for a quantidade inicial de DNA genômico, mais cedo o produto acumulado é detectado na PCR e menor será o valor do CT.

O método escolhido para as análises foi o da Curva Padrão que se baseia na comparação de dados obtidos em uma diluição seriada padrão com os das amostras desconhecidas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004; LARIONOV *et al.*, 2005; DORAK, 2006). Para a utilização deste método, faz-se uma diluição seriada de uma amostra com concentração inicial conhecida relacionando-se os CTs das amostras dessa diluição seriada com os CTs das amostras que serão investigadas. O *software* do equipamento utilizado para as reações de amplificação é capaz de inferir a quantidade de DNA que as amostras em análise contêm: se uma amostra tiver um CT equivalente ao de algum ponto da curva de diluição significa que ela contém a mesma quantidade do gene alvo que este determinado ponto representa.

4.7 Análise dos dados

Para cada amostra a quantidade, em nanogramas, do gene alvo (*RAPH1*) e dos genes de referência (18S, *PUM1* e *ACTB*) tanto em tecido tumoral quanto em tecido sanguíneo foi determinada pelo *Software Realplex 1.5 Eppendorf*. Em seguida, foi calculada a relação (Q) utilizando-se as médias das quantidades obtidas das reações de amplificação do gene alvo e genes de referência nos dois tecidos. O valor de Q foi obtido separadamente para cada gene de referência com auxílio da fórmula (1) (KÖNIGSHOFF *et al.*, 2003).

$$Q = \frac{\text{Tumor(Alvo)}/\text{Tumor (Referência)}}{\text{Sangue (Alvo)}/\text{Sangue(Referência)}} \quad (1)$$

Os coeficientes de variação (CV) a partir das triplicatas dos tumores do gene alvo e dos tumores dos genes de referência foram utilizados para obter o desvio padrão (S) de Q para cada amostra, (2) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

$$CV_1 = \frac{\text{Desvio Padrão Tumor (Alvo)}}{\text{Média Tumor (Alvo)}} \quad CV_2 = \frac{\text{Desvio Padrão Tumor (Referência)}}{\text{Média Tumor (Referência)}}$$

$$CV = (CV_1^2 + CV_2^2)^{1/2}$$

$$S = CV . Q \quad (2)$$

A relação $Q \pm S$ resulta em valores maiores, menores ou igual a 1. Se o valor obtido for > 1 será inferido que o gene alvo encontra-se em maior quantidade que o de referência para aquela paciente, ou seja, amplificado; se o valor for < 1 significa que o gene alvo está em menor quantidade e desta forma encontra-se deletado; se o valor for $= 1$ significa que o gene não sofreu alteração.

4.8 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores tanto do gene alvo *RAPH1*, quanto dos genes de referência (*PUM1*, *18S* e *ACTB*), foram construídos preferencialmente a partir dos exons de maior tamanho, com auxílio da ferramenta IDT *Scitools Real Time PCR* (IDT - *Integrated DNA technologies*, acessado em 23/02/2011), e estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DOS GENES DE REFERÊNCIA E DO GENE ALVO.

Gene	Exon	Iniciador avante	Sonda	Iniciador reverso
<i>18S</i>	-	5' GAGACTCTGGCATGCTAACTAG 3'	5' TGCTCAATCTCGGGTGGCTGAA 3'	5' GGACATCTAAGGGCATCACAG 3'
<i>PUM1</i>	15	5' ACGAATGGCAGTGGAAGATAC 3'	5' TGAAGCCAAGTACCGCAGTGCAA 3'	5' CGAGAGGAAGAGAAAAGAGTGC 3'
<i>ACTB</i>	6	5' AGTCCCTTGCCATCCTAAAAG 3'	5' CCAGTCCTCTCCAAGTCCACAC 3'	5' CAATGCTATCACCTCCCCTG 3'
<i>RAPH1</i>	4	5' TCTTTGAGTATGGATGAGGCTG 3'	5' TGACGCGTTCTTCTGTGCTGATT 3'	5' GTGATGCTGGAATGGGAGG 3'

FONTE: O AUTOR (2012)

4.9 Amplificação por qPCR e padronização

A reação de amplificação foi realizada no equipamento Mastercycler® ep *realplex* em uma placa de 96 poços (Axygen AB-C), com volume final de 10µl, contendo 8 µl de Mix geral (com todos os reagentes necessários para a reação de amplificação: Master MIX com dNTPs, tampão e *Taq* Polimerase além de iniciadores e sondas, nas concentrações de 500 nM e 250nM respectivamente) e 2 µl de DNA genômico de tumor ou sangue periférico, todas as amostras aliqüotadas a uma concentração de 20 ng/µl.

Para cada par de iniciadores e sonda específica foram necessários vários testes de padronização, entre eles: teste inicial de amplificação, gradiente de temperatura de anelamento e titulação dos iniciadores. Para os genes *18S* e *PUM1* os primeiros testes realizados foram suficientes para garantir a padronização das reações com uma boa eficiência, no entanto para os genes *RAPH1* e *ACTB* foram necessários vários outros testes, entre eles: acréscimo de Master MIX, gradiente de MgCl₂ e de *Taq* Polimerase.

Ao final, a reação de amplificação foi padronizada da seguinte maneira: 1) Genes *18S* e *PUM1*: 5 µl de Master MIX, 2,5 µl de água ultra-pura autoclavada, 0,5 µl de iniciadores e sondas e 2 µl de DNA (por reação) 2) Gene *RAPH1*: 6 µl de Master MIX, 1 µl de água ultra-pura autoclavada, 0,5 µl de iniciadores e sondas, 0,3 µl de *Platinum® Taq* DNA Polimerase, 0,2 µl MgCl₂ e 2 µl de DNA (por reação) 3) Gene *ACTB*: 6 µl de Master Mix, 0,6µl de água ultra-pura autoclavavada, 0,5 µl de iniciadores e sondas, 0,5 de *Platinum® Taq* DNA Polimerase, 0,4 de MgCl₂ e 2µl de DNA (por reação).

O ciclo de amplificação também sofreu alterações no decorrer das padronizações e foi definido como: 1) 95°C por 3 minutos, 2) 95°C por 50 segundos, 3) 59.8°C por 30 segundos, 4) 72°C por 30 segundos, 5) passos 2 a 4 repetidos por 45 ciclos.

O gene de referência *ACTB* foi utilizado somente quando os resultados para os genes de referência *PUM1* e *18S* foram discordantes, desta forma os valores de Q assim como os desvios (S) obtidos para cada amostra foram resultantes da média entre os valores obtidos para dois genes de referência concordantes em seus resultados.

4.10 Análises Estatísticas

O programa *SPSS Statistics 17.0* (Windows & Mac) foi escolhido para as análises de regressão e correlação realizadas para as informações clínico-histopatológicas com as informações organizadas da seguinte maneira: 1) casos de amplificação e deleção (atribuiu-se valor 0 para as deleções e 2 para as amplificações) e 2) valores da quantificação relativa (Q).

Foram realizadas análises de regressão logística (método *Enter*) utilizando como variável independente as alterações do gene *RAPH1* e os dados das informações clínico-histopatológicas, um de cada vez, como variável dependente a fim de verificar se as alterações estruturais (amplificações ou deleções) poderiam ser fatores determinantes/causais para alguma destas características. Já as correlações foram realizadas utilizando-se os valores da quantificação relativa (Q) e os valores dos coeficientes de correlação de *Spearman* (ρ) foram considerados nas análises (valores de $p > 0,05$ como não significativos).

Correlações adicionais foram realizadas utilizando os casos de amplificação (2) e deleção (0) do gene *RAPH1* com as alterações dos genes *ACHE* e *BCHE*, proveniente de outros projetos de pesquisa.

Os valores amostrais utilizados nas análises de regressão e nas correlações variam devido as informações disponíveis de cada característica serem diferentes para cada paciente.

5 RESULTADOS

5.1 Construção da Curva Padrão

A curva padrão foi construída em todas as placas, utilizando-se uma amostra de tumor, com 5 pontos em triplicata, fator de diluição 4 nas seguintes concentrações: 256 ng/μl, 64 ng/μl, 16 ng/μl, 4 ng/μl e 1 ng/μl.

A eficiência da reação (E) assim como os demais parâmetros, *slope* (inclinação da curva), R_2 (coeficiente de correlação) e *y-intercept* são fornecidos pelo próprio *software*, sendo o *slope* da curva padrão utilizado para o cálculo da eficiência utilizando-se a fórmula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Um *slope* de -3.32 indica uma reação 100% eficiente, *slopes* mais negativos do que -3.32 (ex: -3.9) indicam reações com eficiência menor de 100% e *slopes* mais positivos que -3.32 (ex: -2.5) podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem. Uma curva padrão é graficamente representada como uma regressão linear semi-log, CT vs. quantidade de ácido nucléico (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008) (Figuras 11 e 12).

O R_2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de CT das amostras da curva padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). Valores de $R_2 < 0,99$ podem indicar problemas de pipetagem e nas triplicatas das amostras e dessa forma a precisão dos resultados pode ser questionável. O *y-intercept* indica o valor esperado de CT para uma amostra com quantidade 1 (por exemplo 1ng/μl) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006; APPLIED BIOSYSTEMS, 2008; EUROGENTEC).

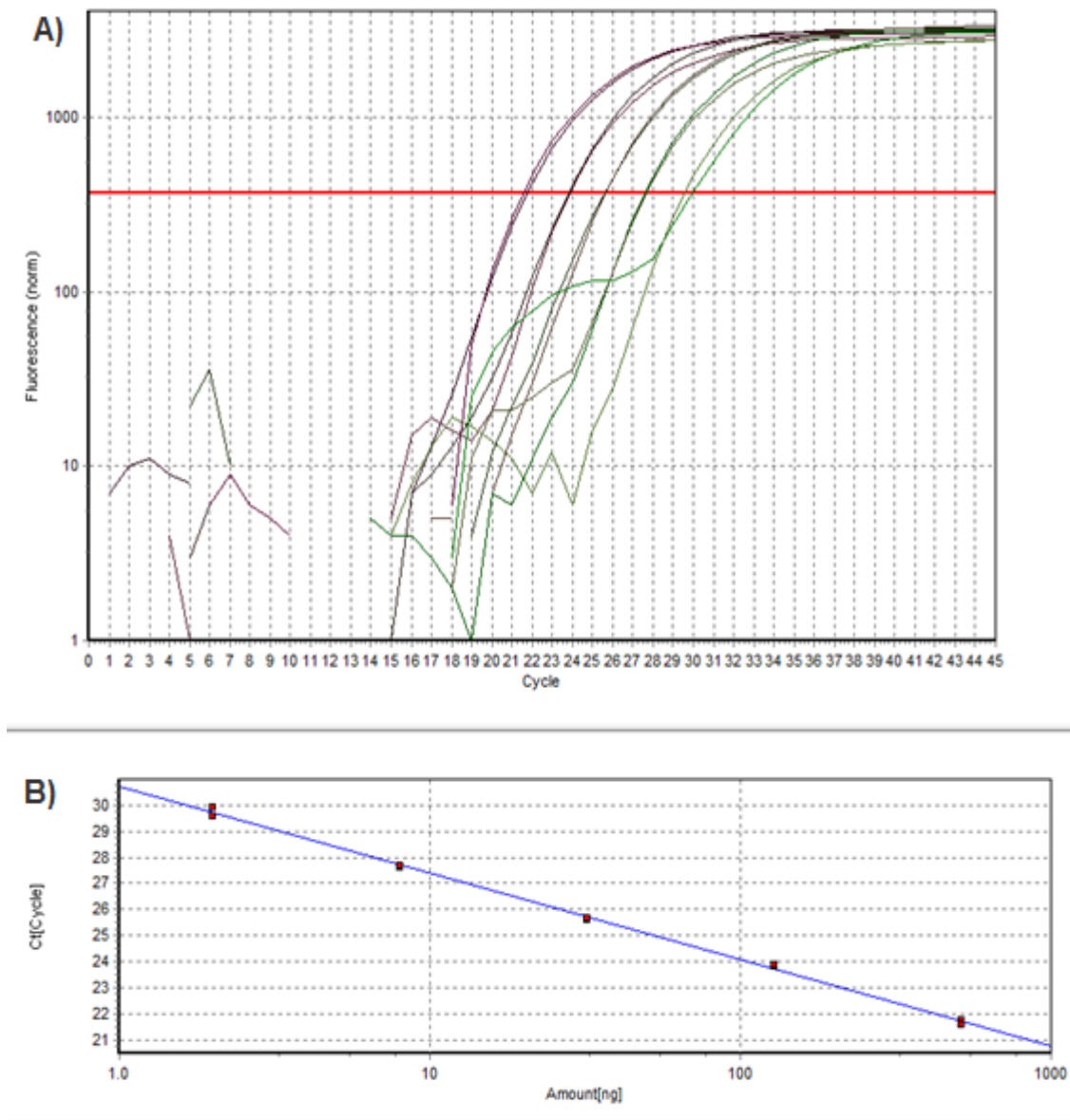


FIGURA 11 – CURVA PADRÃO OBTIDA PARA O GENE *RAPH1* COM $E = 100\%$, $SLOPE -3,323$ E R_2 DE $0,998$. FONTE: O AUTOR (2012). LEGENDA: A) Representação das curvas de amplificação dos cinco pontos de diluição B) Representação semi-log da curva padrão na qual são plotados o CT vs. Quantidade (em nanogramas) de DNA.

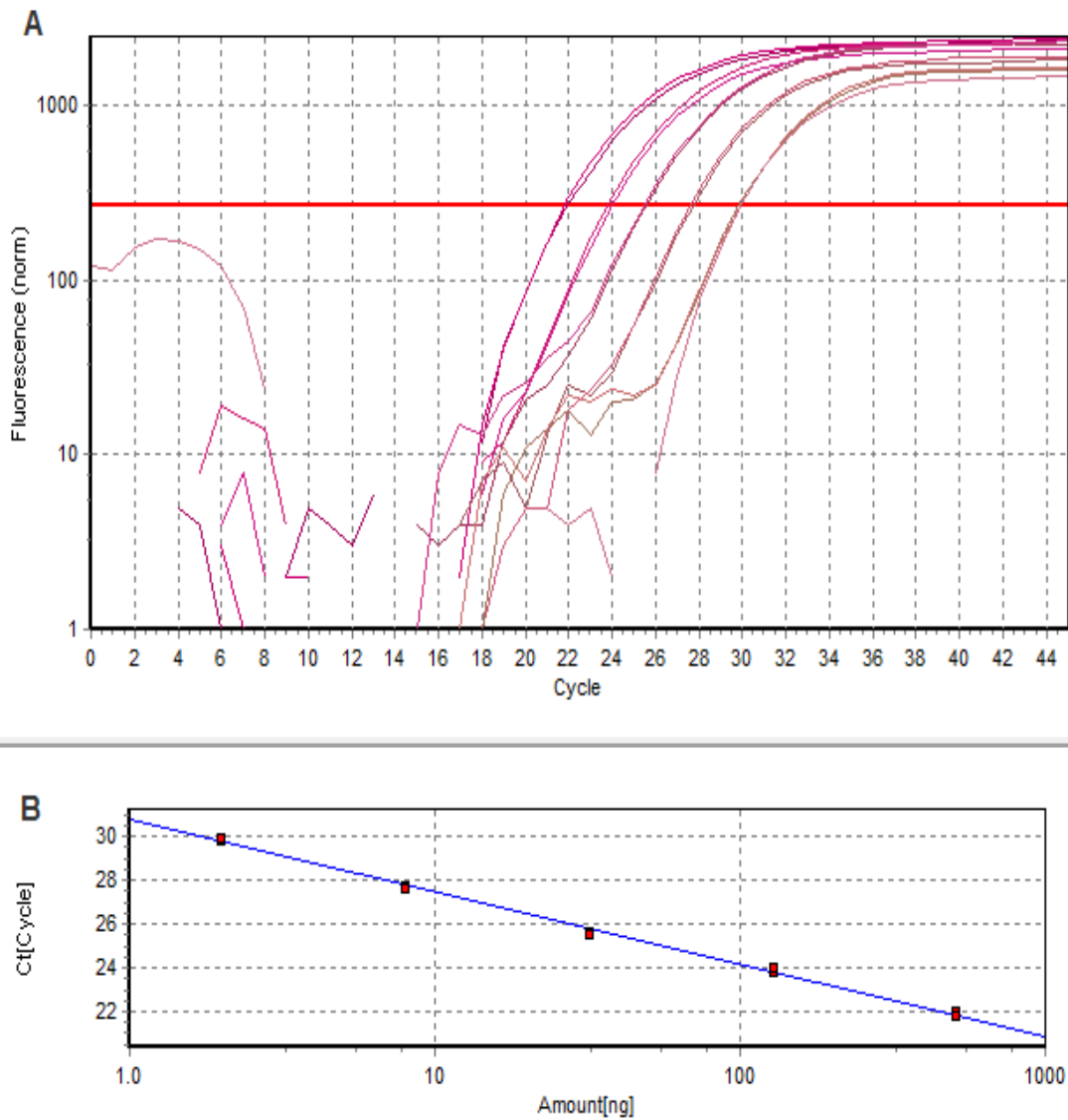


FIGURA 12 - CURVA PADRÃO OBTIDA PARA O GENE *PUM1* COM $E = 100\%$, $SLOPE -3,310$ E R_2 DE $0,997$. FONTE: O AUTOR (2012). LEGENDA: A) Representação das curvas de amplificação dos cinco pontos de diluição B) Representação semi-log da curva padrão na qual são plotados o CT vs. Quantidade (em nanogramas) de DNA

5.2 Amplificação por PCR em Tempo Real

Cada placa foi realizada para um gene em separado contendo: a curva padrão, 13 amostras de tumor e sangue em triplicata e um controle negativo, também em triplicata. Para cada amostra em triplicata, sempre um dos pontos era desativado a fim de se obter os menores desvios possíveis entre os CTs (foram utilizados os valores obtidos para as amostras somente se o desvio $\leq 0,3$) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008). A figura 13 mostra os gráficos de amplificação obtidos em cada placa.

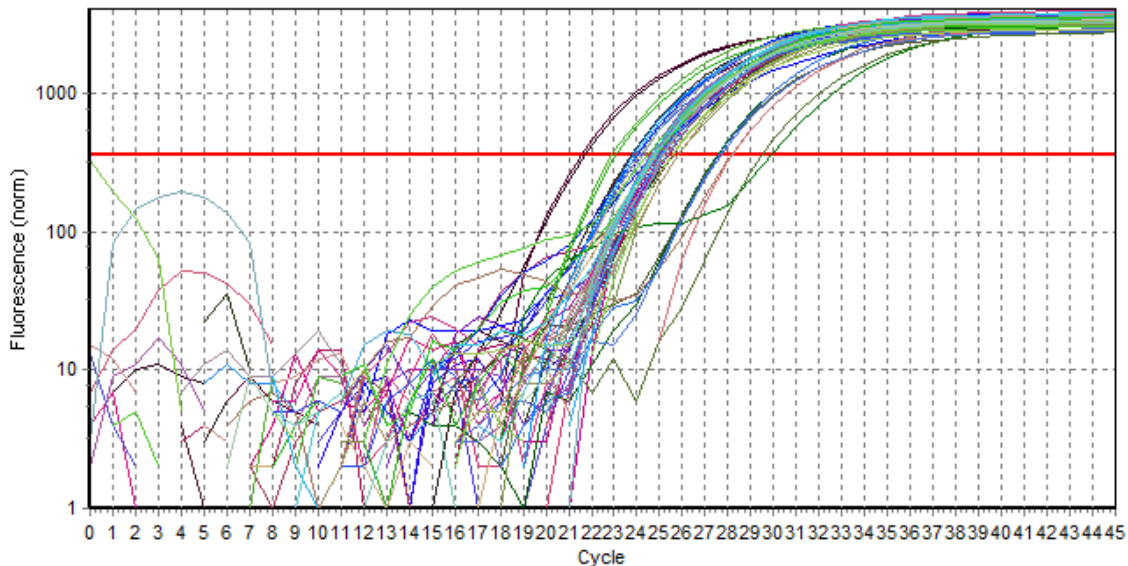


FIGURA 13 - GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDO PARA UMA DAS PLACAS REALIZADAS PARA O GENE *RAPH1*. FONTE: O AUTOR (2012).

A tabela 3 descreve as eficiências, *slopes* e valor de R^2 obtidos para as 17 placas realizadas. Devido ao gene de referência *ACTB* ter sido utilizado somente em 19 amostras (para as quais os resultados do tipo de alteração foram discordantes em relação aos outros dois genes de referência), somente 2 placas foram necessárias, diferentemente dos demais genes nos quais foram necessárias 5 placas cada um para obter-se resultados para todas as amostras.

TABELA 3 – VALORES DE SLOPE, R₂ E EFICIÊNCIA (E) OBTIDOS PARA TODOS OS GENES.

Gene	Slope	R ²	Eficiência (E)
<i>RAPH1</i>	-3.323	0.998	100%
	-3.333	0.990	100%
	-3.333	0.993	100%
	-3.319	0.991	100%
	-3.333	0.993	100%
<i>PUM1</i>	-3.301	0.997	101%
	-3.287	0.993	101%
	-3.320	0.996	100%
	-3.311	0.993	100%
	-3.317	0.997	100%
<i>18S</i>	-3.313	0.997	100%
	-3.332	0.993	100%
	-3.316	0.996	100%
	-3.323	0.992	100%
	-3.316	0.995	100%
<i>ACTB</i>	-3.316	0.996	100%
	-3.324	0.994	100%

FONTE: O AUTOR (2012).

5.3 Alteração do número de cópias do gene *RAPH1*

O valor relativo de Q foi calculado para cada amostra utilizando a fórmula (1) a partir dos valores obtidos em nanogramas nas reações de amplificação para cada gene (Figura 14). Para determinar o tipo de alteração (amplificação ou deleção) foi feita uma média dos valores de Q, assim como uma média dos valores de desvio (S) utilizando dois genes de referência com resultados concordantes (*PUM1* e *18S*, concordância em $N=31$; *18S* e *ACTB*, $N=15$ e *PUM1* e *ACTB*, $N=6$), e verificado se $Q_{(médio)} \pm S_{(médio)} > 1$ (amostras amplificadas) ou $Q_{(médio)} \pm S_{(médio)} < 1$ (amostras deletadas), com I.C de 95%. Em nenhum dos casos o número de cópias do gene *RAPH1* mostrou-se inalterado. Os valores médios de Q, a média dos desvios, assim como a alteração encontrada para cada amostra estão descritos na tabela 4.

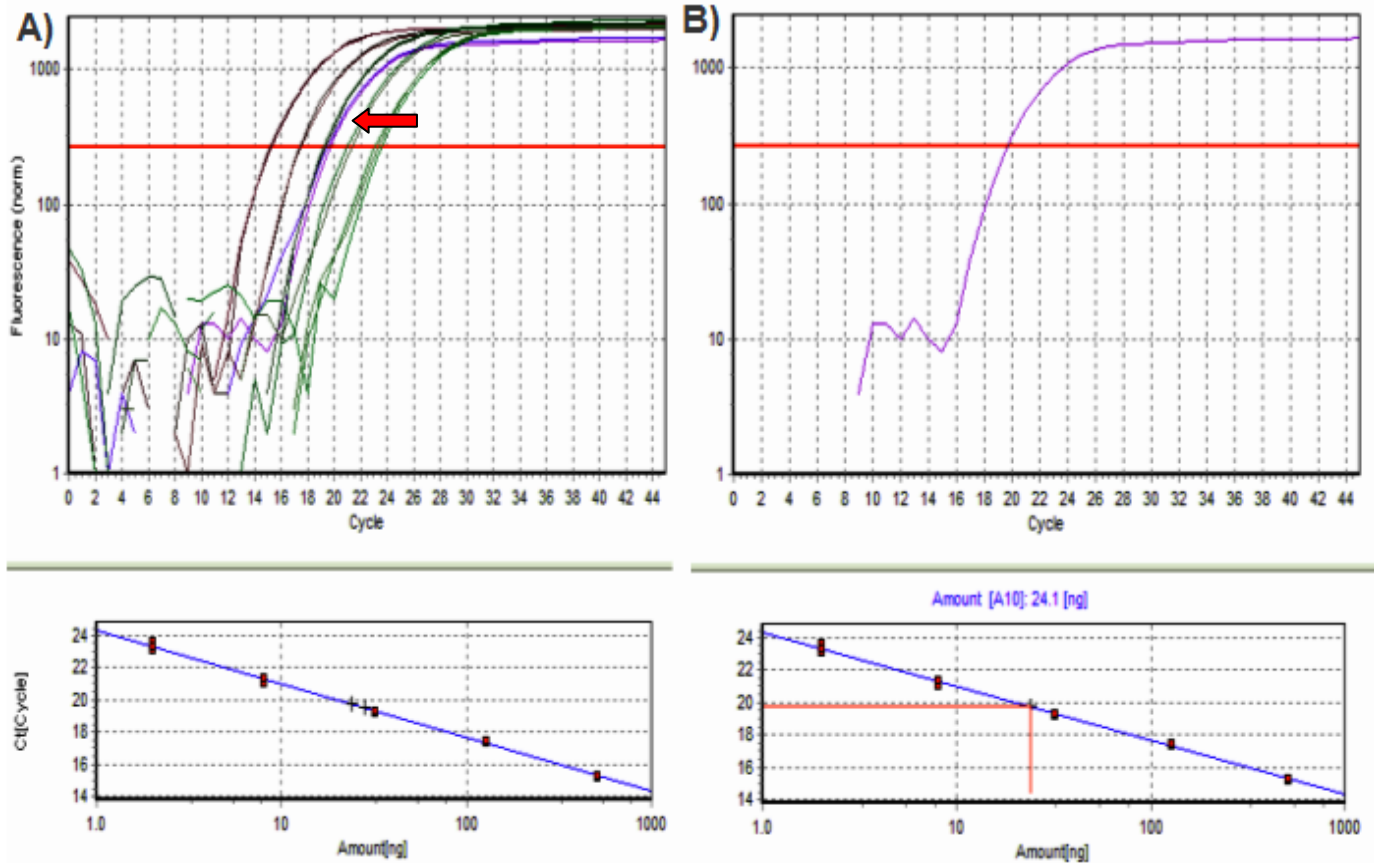


FIGURA 14 – CURVA PADRÃO DO GENE 18S ($E = 100\%$, $R^2 = 0,997$ E $SLOPE = 3.313$) E CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DE UMA AMOSTRA CONTROLE. FONTE: O AUTOR (2012). LEGENDA: A) Acima: Representação das curvas de amplificação de uma das amostras em duplicata com concentração prévia desconhecida (seta) interpolada na curva padrão (demais curvas de amplificação); Abaixo: As cruzes representam os pontos em que a amostra está localizada na curva padrão em sua representação semi-log. B) Acima: Curva de amplificação individual da amostra; Abaixo: A quantidade exata obtida em nanogramas a partir da curva padrão.

TABELA 4 – VALOR MÉDIO DE Q E MÉDIA DOS DESVIOS (CONSIDERANDO DOIS GENES DE REFERÊNCIA) E TIPO DE ALTERAÇÃO ENCONTRADA PARA AS 52 AMOSTRAS ANALISADAS PARA O GENE ALVO *RAPH1* E GENES DE REFERÊNCIA *PUM1*, *18S* E *ACTB*. **A** – GENE ALVO AMPLIFICADO ($Q_{(médio)} \pm S_{(médio)} > 1$) **D** - GENE ALVO DELETADO ($Q_{(médio)} \pm S_{(médio)} < 1$).

(continua)

Amostra	Média do valor de Q	Média do Desvio (S)	Alteração
1	0,56147 ±	0,0015	D ²
2	1,17344 ±	0,0015	A ²
3	0,24823 ±	0,0052	D ²
4	1,62702 ±	0,0020	A ³
5	2,36422 ±	0,0005	A ³
6	1,22119 ±	0,0043	A ¹
7	0,63652 ±	0,0017	D ¹
8	0,72151 ±	0,0133	D ²
9	1,12948 ±	0,0012	A ¹
10	0,43886 ±	0,0071	D ¹
11	1,51613 ±	0,0044	A ¹
12	1,83078 ±	0,0030	A ²
13	0,59184 ±	0,0062	D ¹
14	0,83126 ±	0,0024	D ²
15	1,39832 ±	0,0150	A ²
16	1,02816 ±	0,0004	A ³
17	0,75076 ±	0,0078	D ¹
18	0,63167 ±	0,0052	D ¹
19	0,4467 ±	0,0022	D ²
20	0,41857 ±	0,0055	D ¹
21	1,63662 ±	0,0098	A ¹
22	0,16573 ±	0,0025	D ²
23	0,62394 ±	0,0030	D ³
24	0,77356 ±	0,0017	D ²
25	0,85011 ±	0,0059	D ¹
26	1,4734 ±	0,0062	A ¹
27	2,14605 ±	0,0019	A ²
28	0,69851 ±	0,0060	D ¹
29	1,93462 ±	0,0438	A ¹
30	2,80845 ±	0,0008	A ³
31	0,91323 ±	0,0213	D ¹
32	1,56423 ±	0,0025	A ¹
33	1,48014 ±	0,0002	A ²
34	2,83062 ±	0,0809	A ²
35	0,62089 ±	0,0038	D ¹
36	0,39137 ±	0,0012	D ¹

TABELA 4 – VALOR MÉDIO DE Q E MÉDIA DOS DESVIOS (CONSIDERANDO DOIS GENES DE REFERÊNCIA) E TIPO DE ALTERAÇÃO ENCONTRADA PARA AS 52 AMOSTRAS ANALISADAS PARA O GENE ALVO *RAPH1* E GENES DE REFERÊNCIA *PUM1*, *18S* E *ACTB*. **A** – GENE ALVO AMPLIFICADO ($Q_{(médio)} \pm S_{(médio)} > 1$) **D** - GENE ALVO DELETADO ($Q_{(médio)} \pm S_{(médio)} < 1$).

Amostra	Média do valor de Q	Média do Desvio (S)	(conclusão)
			Alteração
37	0,81604 ±	0,0025	D ¹
38	0,21365 ±	0,0023	D ¹
39	0,50138 ±	0,0078	D ¹
40	0,11186 ±	0,0018	D ¹
41	0,84815 ±	0,0041	D ¹
42	0,2974 ±	0,0023	D ¹
43	0,86615 ±	0,0062	D ²
44	0,72755 ±	0,0018	D ³
45	0,66422 ±	0,0401	D ²
46	0,72304 ±	0,0125	D ¹
47	0,49782 ±	0,0027	D ¹
48	0,70661 ±	0,0223	D ¹
49	3,56984 ±	0,0683	A ¹
50	6,29024 ±	0,0224	A ¹
51	0,16206 ±	0,0049	D ¹
52	0,32196 ±	0,0131	D ¹

Genes de referência utilizados: ¹ – *PUM1* e *18S*
² – *18S* e *ACTB*
³ – *PUM1* e *ACTB*

FONTE: O AUTOR (2012).

Observou-se para as 52 amostras analisadas deleção do gene *RAPH1* em 63,5% delas, enquanto que em 36,5% das amostras o gene mostrou-se amplificado ($p=0,0522$) (Gráfico 1).

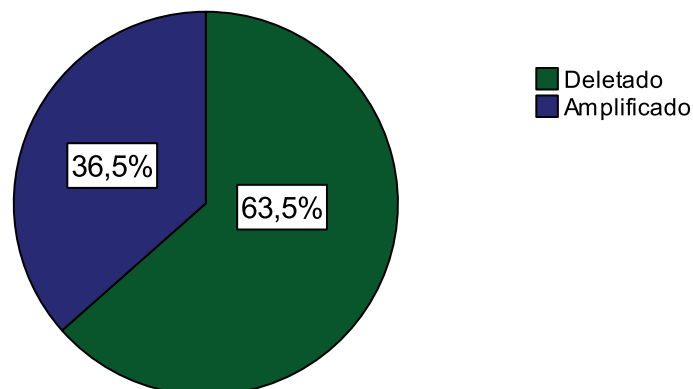


GRÁFICO 1 - ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PARA O GENE *RAPH1* NAS 52 AMOSTRAS ANALISADAS.

FONTE: O AUTOR (2012).

A Tabela 5 apresenta a estatística descritiva considerando o valor médio de Q para dois genes de referência, nas amostras deletadas e amplificadas.

TABELA 5 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS OU DELETADAS PARA O GENE *RAPH1*, CONSIDERANDO A MÉDIA DE Q PARA DOIS GENES DE REFERÊNCIA.

Valor relativo de Q	N	Valor mínimo	Valor máximo	Média	Desvio Padrão
Amostras amplificadas	19	1,028	6,290	2,054	1,223
Amostras deletadas	33	0,112	0,91323	0,569	0,230

FONTE: O AUTOR (2012).

5.4 Amplificações e deleções do gene *RAPH1* e dados clínico-histopatológicos

Os dados clínico-histopatológicos escolhidos para as análises de regressão e correlação foram os que apresentaram menos de 40% de ausência de informações para as pacientes (categoria SI \leq 40%, conforme a tabela 1, exceto idade da paciente), uma vez que quanto menor o tamanho amostral, menor será a confiabilidade dos resultados obtidos. As características consideradas nas análises foram: metástases nos linfonodos, grau do tumor, tamanho do tumor, receptores de estrogênio e progesterona, amplificação do gene *HER2* e patologia.

A tabela 6 mostra os resultados obtidos a partir das análises de regressão binária logística quando utilizado o tipo de alteração do gene *RAPH1* como variável independente e as variáveis com valores dicotômicos como variáveis dependentes, sendo elas: metástases nos linfonodos (1: ausência e 2: presença), receptores de estrogênio e progesterona (1: ausência e 2: presença), e amplificação do gene *HER2* (1: não amplificado 2: amplificado). Nenhuma das variáveis mostrou valores significativos ($p > 0,05$ I.C 95%) quando relacionadas às alterações estruturais do gene *RAPH1*. Para as demais características clínico-histopatológicas, categorizadas em mais de 2 classes: grau do tumor (I, II e III), tamanho do tumor (1: 5-24mm; 2: 25-44mm; 3: 45-64mm e 4: 65-84mm) e patologia (1: ductais; 2: lobulais; 3: tubulares e 4: outros) foram feitas análises de regressão multinomais e que também não apresentaram valores significativos ($p > 0,05$ I.C 95%).

Foram realizados testes de correlação de *Spearman* (ρ) utilizando-se o valor relativo de Q e todas as demais características histo-patológicas (Tabela 7), nos quais os coeficientes de correlação obtidos também não se mostraram significativos para nenhuma das variáveis analisadas ($p \geq 0,05$).

TABELA 6 – VALORES OBTIDOS (B, E.P - ERRO PADRÃO, TESTE WALD, GRAU DE LIBERDADE - GL, SIGNIFICÂNCIA - SIG E EXP (B)) A PARTIR DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO REALIZADAS PARA AS VARIÁVEIS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS BINÁRIAS: METÁSTASE NOS LINFONODOS AXILARES, RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *HER2*, UTILIZANDO AS ALTERAÇÕES DO GENE *RAPH1* COMO VARIÁVEL INDEPENDENTE.

Variáveis Dependentes	N	B	E.P	Wald	g.l	Sig.	Exp(B)	95% I.C para EXP(B)	
								Menor	Maior
Metástase nos linfonodos axilares	42	0,347	0,320	1,173	1	0,279*	1,414	0,755	2,648
Constante ^a		-0,575	0,417	1,977	1	0,167	0,563		
Receptor de Estrogênio	34	0,447	0,591	0,572	1	0,449*	1,563	0,491	4,978
Constante		1,504	0,553	7,404	1	0,007	4,500		
Receptor de Progesterona	33	0,539	0,583	0,856	1	0,355*	1,715	0,547	5,375
Constante		1,224	0,509	5,786	1	0,016	3,400		
Amplificação do gene <i>HER2</i>	34	0,118	0,496	0,057	1	0,812*	1,125	0,425	2,978
Constante		-1,846	0,621	8,827	1	0,03	0,158		

^a A constante é utilizada para os cálculos de regressão e é obtida separadamente em cada análise

* Valores considerados não-significativos $>0,05$

FONTE: O AUTOR (2012).

TABELA 7 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE *SPEARMAN* (ρ) ENTRE OS VALORES RELATIVOS DE Q PARA O GENE *RAPH1* E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS.

Correlação de <i>Spearman</i>	Variáveis	N	(ρ)	Valor de p (bicaudal)
	Metástase nos linfonodos axilares	42	0,159	0,315*
	Grau do tumor	43	-0,061	0,698*
	Tamanho do tumor (cm)	41	0,162	0,312*
	Receptor de Estrogênio	34	0,174	0,326*
	Receptor de Progesterona	33	0,231	0,196*
	Amplificação do <i>HER2</i>	34	-0,123	0,489*
	Patologia	47	0,061	0,683*

* Valores considerados não significativos ($p > 0,05$)

FONTE: O AUTOR (2012).

5.5 Amplificações e deleções do gene *RAPH1* e genes *ACHE* e *BCHE*

A fim de enriquecer os resultados obtidos neste estudo, utilizaram-se informações disponíveis de outros projetos de pesquisa do presente grupo, entre eles BERNARDI *et al.*, (2010), nas quais foram analisadas as amplificações e deleções dos genes *ACHE* e *BCHE*, para as mesmas amostras de carcinoma mamário utilizadas neste estudo. Para tanto, foram realizadas análises de correlação de *Spearman* considerando as alterações do gene *RAPH1* juntamente com os resultados obtidos para os genes *ACHE* e *BCHE*.

Para o gene *ACHE* foram observados 51,16% de casos de amplificação em relação a 48,84% casos de deleção, já para o gene *BCHE* estavam amplificadas 42,55% das amostras e 57,45% deletadas. Estes valores não foram significativamente diferentes quando comparados aos casos de amplificação e deleção do gene *RAPH1* utilizando o teste χ^2_{corr} ($p = 0,2208$ e $p=0,6850$ para os genes *ACHE* e *BCHE*, respectivamente).

Foram observadas correlações positivas e significantes de 38% ($p=0,012$) e 33% ($p=0,020$) entre os genes *RAPH1* e os genes *ACHE* e *BCHE*, respectivamente, quando os casos de amplificação e deleção foram considerados (Tabela 8, gráfico 2 para o gene *ACHE* e 3 para o gene *BCHE*). O número de deleções e amplificações encontrado tanto para o *RAPH1* e *ACHE* quanto *RAPH1* e *BCHE* estão descritos nos gráficos 4 e 5, respectivamente.

TABELA 8 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE *SPEARMAN* (ρ) ENTRE AS ALTERAÇÕES (AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES) DO GENE *RAPH1* E AS AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES DOS GENES *ACHE* E *BCHE*.

Correlação de <i>Spearman</i>	Gene	N	(ρ)	Valor de p (bicaudal)
	<i>ACHE</i>	43	0,381	0,012**
	<i>BCHE</i>	47	0,337	0,020**

** Valores significativos ($p \leq 0,05$)

FONTE: O AUTOR (2012).

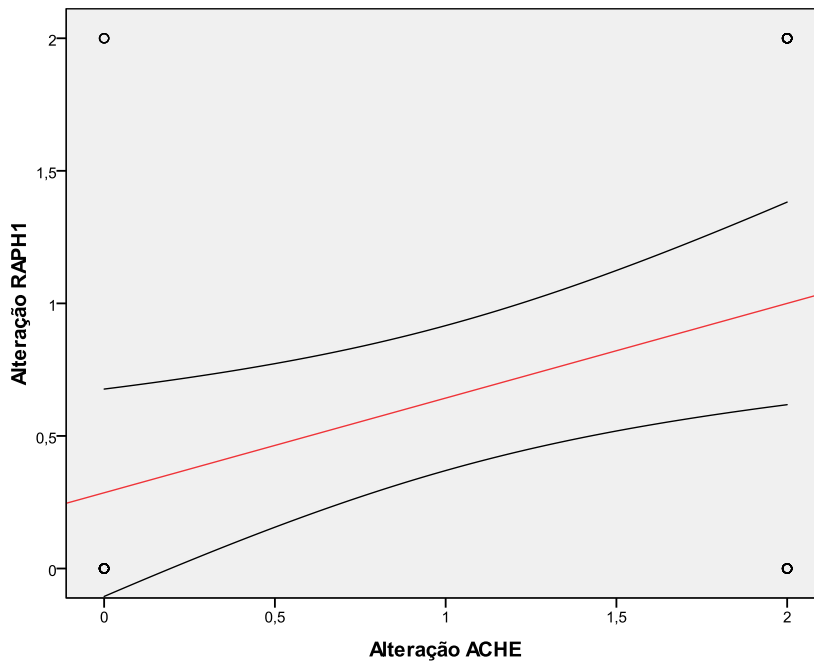


GRÁFICO 2 - GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *RAPH1* E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *ACHE*. FONTE: O AUTOR (2012). LEGENDA: Alteração *RAPH1* = amplificações e deleções do gene *RAPH1*; Alteração *ACHE* = amplificações e deleções do gene *ACHE*. 0 = deleção, 2 = amplificação (N=43 I.C 95%).

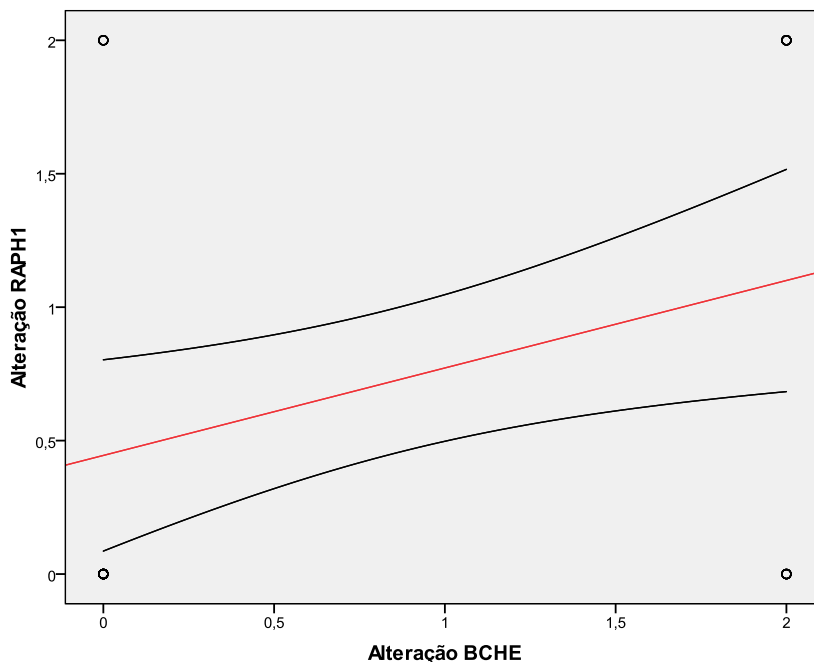


GRÁFICO 3 - GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *RAPH1* E A VARIÁVEL AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES ENCONTRADA PARA O GENE *BCHE*. FONTE: O AUTOR (2012). LEGENDA: Alteração *RAPH1* = amplificações e deleções do gene *RAPH1*; Alteração *BCHE* = amplificações e deleções do gene *BCHE*. 0 = deleção, 2 = amplificação (N=47 I.C 95%).

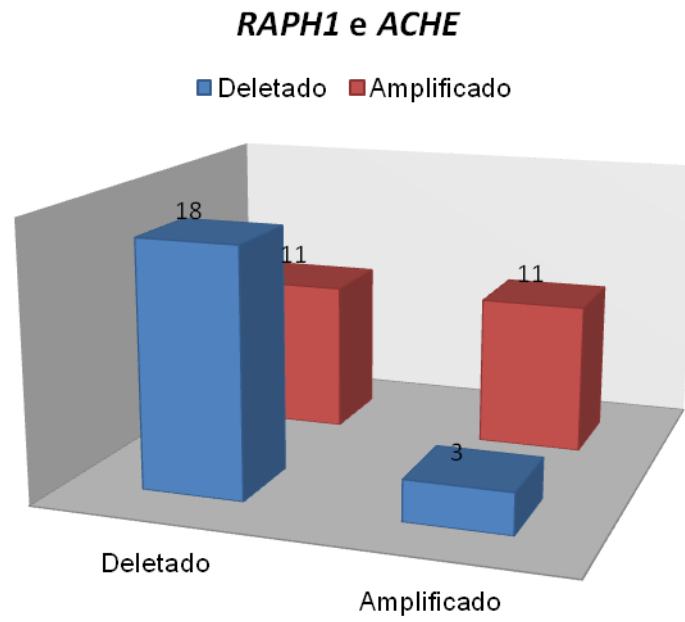


GRÁFICO 4 – AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES DOS GENES *RAPH1* E *ACHE*. FONTE: O AUTOR (2012).

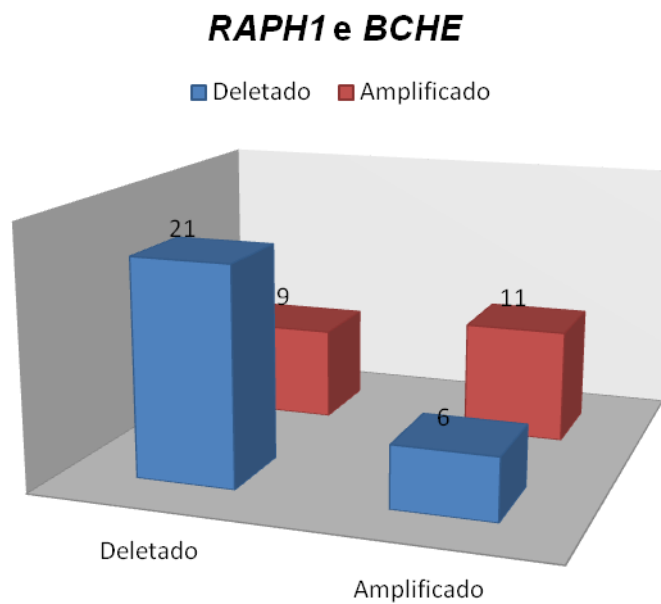


GRÁFICO 5 – AMPLIFICAÇÕES E DELEÇÕES DOS GENES *RAPH1* E *BCHE*. FONTE: O AUTOR (2012).

6 DISCUSSÃO

6.1 Alterações do gene *RAPH1* e câncer

O câncer é causado, em parte, por mutações irreversíveis no material genético as quais podem ocorrer em diferentes locais no genoma e contribuir para a progressão da doença (TAYLOR *et al.*, 2008). As alterações mais frequentes são aquelas que alteram o número de cópias de genes essenciais ao desenvolvimento e progressão das neoplasias, e entre elas encontram-se as amplificações e as deleções (BUERGER *et al.*, 1999; FOROZAN *et al.*, 2000).

A proteína lamelipodina (Lpd), codificada pelo gene *RAPH1*, está envolvida em processos como protrusão lamelipodial e motilidade celular, assim como em proliferação de células e tecidos (LAFUENTE *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2004; LYULCHEVA *et al.*, 2008). Dessa forma, optou-se por investigar se alterações estruturais (amplificações e deleções) do gene *RAPH1* estariam envolvidas na tumorigênese ou progressão de células de carcinoma mamário e principalmente se estariam envolvidas no processo de metástase, uma vez que a Lpd é uma proteína que contribui de modo considerável para a motilidade celular.

Conforme o gráfico 1, foi observado que todas as amostras das pacientes analisadas (N=52) possuem alteração no gene *RAPH1*, sendo que em 63,5% dos casos verificou-se que o gene encontra-se deletado em relação aos 36,5% de amostras em que ele encontra-se amplificado. Este resultado coincide com os resultados descritos na literatura para os quais a região do gene *RAPH1* (2q33) está deletada em diversos tipos de cânceres, entre eles: carcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de boca, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células escamosa do esôfago, neuroblastoma e câncer de pulmão (OTSUKA *et al.*, 1996; PACK *et al.*, 1999; TAKITA *et al.*, 2001; BEDER *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2003).

A deleção freqüente da região 2q33 em cânceres e conseqüentemente do gene *RAPH1* poderia explicar a diminuição da sua expressão observada por DAHL *et al.*, (2005) em 43% das amostras de cânceres de mama e 25% em amostras de câncer de ovário.

Resultados encontrados por EPPERT *et al.*, (2005) mostram uma freqüência de 67% de Perda de Heterozigose (LOH) do gene *RAPH1* em amostras de osteossarcomas primários assim como uma diminuição da expressão do gene quando comparadas amostras de tumores primários e metastáticos (pareadas), sugerindo uma possível

importância do gene tanto para o desenvolvimento da doença, uma vez que ele encontra-se deletado em tumores primários, quanto para a progressão de tumores primários para tumores metastáticos, por mecanismos de diminuição da expressão gênica. De maneira geral, para osterossarcomas, seria possível sugerir que o gene *RAPH1* estaria atuando como um gene supressores de tumor, por supor que sua deleção ou diminuição da expressão possa ser importante para conceder vantagens ao tumor em crescimento ou permitir que as células se tornem metastáticas.

Apesar de a maioria das amostras encontrarem-se deletadas, 36,5% delas mostrou amplificação para o gene *RAPH1*. Não existe nenhum trabalho na literatura relatando amplificação do número de cópias deste gene, no entanto é possível que ele se encontre próximo a proto-oncogenes e sua amplificação ocorra de maneira acidental em alguns tumores (ZAKUT *et al.*, 1991). O gene *erbB-4*, da mesma família do gene *erbB-2* (também conhecido como *HER2*), relacionado a crescimento, diferenciação e proliferação de tecidos (CARRAWAY *et al.*, 1997), situa-se na posição 2q34 muito próxima da região em que se localiza o gene *RAPH1* (2q33) e já foi descrito como amplificado em 13,1% de amostras de câncer de mama (VOGT *et al.*, 1998).

A fim de se obter alguma relação entre alterações do gene *RAPH1* e desenvolvimento e progressão do câncer em amostras de carcinoma mamário, foram feitas análises utilizando os resultados obtidos e as informações clínico-histopatológicas das pacientes.

6.2 Amplificações e deleções do gene *RAPH1* e dados clínico-histopatológicos.

As principais características clínico-histopatológicas das pacientes amplamente utilizadas como fatores de prognóstico em câncer de mama são: tamanho do tumor, grau histológico, receptores hormonais, amplificação do gene *HER2* e metástases nos linfonodos axilares. Estas informações são importantes também para modelos terapêuticos específicos para cada paciente, aumentando a sobrevida (WINER *et al.*, 2001; GOLDBIRSCH *et al.*, 2003; MARTY *et al.*, 2005; CHIURI *et al.*, 2007). As informações disponíveis para estas características, incluindo também tipo de patologia, foram analisadas em conjunto com os resultados de amplificação e deleção encontrados para o gene *RAPH1* através de análises de regressão e correlação.

Nas análises de regressão foram utilizadas as alterações encontradas, sendo (2) amplificações e (0) deleções, como variável independente e as características: grau do tumor, metástase nos linfonodos axilares, tamanho do tumor receptores de estrogênio e progesterona, amplificação do gene *HER2* e patologia como variável dependente. O objetivo foi determinar se as alterações do gene *RAPH1* seriam fatores determinantes ou causais para alguma destas características, principalmente para metástase nos linfonodos e tamanho do tumor, características as quais já foram associadas à função da proteína Lpd (motilidade e proliferação celular, respectivamente), no entanto nenhum dos valores obtidos mostrou-se significativo.

Também foram realizadas análises de correlação de *Spearman* utilizando os valores de Q ao invés do tipo de alteração, com as mesmas características clínico-histopatológicas descritas acima e também não se observou nenhuma correlação significativa. No caso específico do tamanho do tumor, mesmo se o resultado para esta característica tivesse sido significativo não seria possível afirmar com certeza uma relação causal uma vez que o tamanho do tumor é determinado por diversos fatores, entre eles: tempo decorrido até o diagnóstico e as características biológicas de cada tumor (WEEDON-FEKJÆR *et al.*, 2008).

Dessa forma, pode-se admitir que as alterações encontradas no gene *RAPH1* não podem ser consideradas fatores preditivos acerca das informações analisadas, e desta forma o fato de o gene estar amplificado ou deletado não apresenta nenhuma importância em relação ao desenvolvimento ou progressão da doença, diferentemente do que foi encontrado por EPPERT *et al.* (2005) em osteossarcomas, como acima referido (página 46). Uma das justificativas seria o fato de que cada tipo de câncer possui características peculiares de desenvolvimento e progressão e genes de grande importância no processo de tumorigênese em osteossarcomas podem não ser os mesmos envolvidos em câncer de mama, embora existam alguns de importância comum (HANSEN, 1991; WEINBERG, 2000; FUTREAL *et al.*, 2004; DAHL *et al.*, 2005).

Sabendo a relação da proteína Lpd com motilidade celular e metástase descrita na literatura, é possível analisar os motivos pelos quais as alterações no gene *RAPH1* não estariam interferindo para um aumento ou diminuição de casos de metástase nos linfonodos.

Existem dois aspectos a serem considerados:

1) A amplificação do gene *RAPH1* não aumenta a incidência de metástase nos linfonodos;

2) A deleção do gene *RAPH1* não diminui a incidência de metástase nos linfonodos.

Devido ao trabalho publicado por KRAUSE *et al.* (2004) no qual foi verificado um aumento da velocidade de protrusão lamelipodial quando a proteína Lpd estava superexpressa, poderia ser levantada a hipótese de que a amplificação do gene *RAPH1* levaria a um aumento da expressão da proteína Lpd em câncer de mama e que desta forma aumentariam as chances de metástase nos linfonodos pelo aumento da motilidade celular. No entanto, nem sempre o aumento do número de cópias de um gene determina aumento significativo da expressão gênica, estes valores podem variar dependendo do tipo de tumor (MYLLYKANGAS e KNUUTILA, 2005). Em câncer de mama estudos indicaram aumento da expressão em 44 e 62% dos casos de amplificação gênica (HYMAN *et al.*, 2002; POLLACK *et al.*, 2002).

Uma das possíveis explicações para o não aumento da incidência de metástases apesar da amplificação do gene *RAPH1* e hipoteticamente do aumento da expressão da proteína Lpd, seria o de que existem outras proteínas que seriam capazes de regular negativamente e de forma intensa a motilidade celular. O trabalho de BAE *et al.* (2010) mostrou que a proteína Profilina (Pfn1) pode inibir a motilidade celular em células MDA-MB-231 de linhagem de câncer de mama, por se ligar aos mesmos fosfoinosítídeos (PI (3,4)P₂) que a Lpd utiliza para recrutar as proteínas Ena/VASP e induzir a montagem do citoesqueleto de actina, os sítios indisponíveis para a Lpd impediriam que esta atuasse a favor da motilidade celular. Da mesma forma, quando a proteína Pfn1 está menos expressa, os sítios se tornam livres para que a Lpd atue e cause hipermotilidade. Sendo assim pode-se sugerir que, neste caso, a presença da proteína Pfn1 poderia ser essencial para impedir o aumento da motilidade celular em células de câncer de mama e o papel da Lpd estaria atenuado.

O segundo aspecto a ser considerado seria o de que quando o gene *RAPH1* está deletado poderia ocorrer por consequência uma diminuição da incidência de metástase nos linfonodos, uma vez que a proteína Lpd não estaria disponível para atuar como adaptadora de sinais e promover a montagem do citoesqueleto de actina. No entanto, existe uma série de outras proteínas sabidamente envolvidas no processo de remodelamento do citoesqueleto de actina e que também atuam no processo de metástase, entre elas: cofilina, Arp 2/3, LASP-1, Mena e Palladina (ROY *et al.*, 2004;

WITTENMAYER *et al.*, 2004; DI MODUGNO *et al.*, 2007; GOICOECHEA *et al.*, 2009) que poderiam estar desempenhando seus papéis normalmente mesmo com a ausência da Lpd.

O trabalho de GERTLER *et al.*, (2011) sugere a importância da proteína Mena (pertencente à família Ena/VASP) como um possível marcador para risco de metástase. Foram encontradas isoformas superexpressas desta proteína responsáveis por aumentar o nível de protrusão celular e habilidades migratórias, ao mesmo tempo em que outras isoformas estavam seletivamente menos expressas. A mudança de expressão das isoformas permite ao tumor metastizar em resposta a vários estímulos, entre eles o fator EGF. Outras proteínas já foram descritas como associadas à proteína Mena, entre elas as proteínas TES e Palladina (STRICKLAND *et al.*, 2006; GOICOECHEA *et al.*, 2009). A proteína Palladina possui a mesma capacidade da Lpd em se ligar às proteínas Ena/VASP (BOUKHELIFA *et al.*, 2004) e também é conhecida por contribuir para a motilidade invasiva de células em câncer de mama. GOICOECHEA *et al.*, (2009) mostraram um aumento da expressão da proteína Palladina em quatro linhagens de câncer de mama invasivas, além de um importante papel desta proteína na formação de podossomas (estruturas que funcionam para aderir e degradar a matriz extracelular), os quais têm sido encontrados em muitos tipos de células invasivas.

Além das proteínas responsáveis por atuar diretamente no citoesqueleto de actina, existem outros genes responsáveis por codificar muitos outros componentes que atuam nas vias que fazem com que uma célula adquira a capacidade de migrar (WANG *et al.*, 2005). Desta maneira o gene *RAPH1* seria somente mais um componente de inúmeras vias que culminam em aumento de motilidade e metástase e não apresenta um papel determinante em células de carcinoma mamário. Em outros tipos de câncer talvez ele apresente alguma contribuição mais efetiva.

6.3 *RAPH1* e as colinesterases

Foi observada uma correlação positiva e significativa entre as ampliações e deleções do gene *RAPH1* e as mesmas alterações nos genes das colinesterases (gráficos 4 e 5), *ACHE* ($p= 0,012$) e *BCHE* ($p=0,020$) os quais já foram previamente associados ao processo de tumorigênese (ZAKUT *et al.*, 1990; STEPHENSON *et al.*, 1996; SMALL *et al.*, 1996; BURDALL *et al.*, 2003).

O trabalho de BERNARDI *et al.*, (2010) já havia mostrado deleções em 43,64% e 56,36% das amostras de carcinoma mamário, respectivamente para os genes *ACHE* e *BCHE* e ampliações em aproximadamente 23% dos casos. No mesmo trabalho também foram observadas correlações positivas entre ampliações e deleções entre estes dois genes. Uma das explicações proposta para as ampliações ou deleções conjuntas seria a de alterações casuais que poderiam ocorrer devido à proximidade a outros genes importantes no desenvolvimento do câncer, como proto-oncogenes e genes supressores de tumor (ZAKUT *et al.*, 1991; BERNARDI, 2008), uma vez que os genes das colinesterases se localizam em regiões cromossômicas distintas (*ACHE* - 7q22 e *BCHE* 3q26.1-q26.2). O mesmo é possível dizer para a correlação encontrada entre estes genes e o gene *RAPH1*, já que sua localização cromossômica (2q33) também é diferente das colinesterases.

Outra hipótese seria a da instabilidade genômica, muito importante para o acúmulo de mutações essenciais para o desenvolvimento do câncer. A instabilidade genômica, de maneira geral, pode ser observada a nível de nucleotídeo e resulta em substituições, inserções ou deleções causando mutações funcionais em genes de certas proteínas. Ou então, como observado na maioria dos tumores, a instabilidade ocorre a nível cromossômico, resultando em ganhos e perdas de todo o cromossomo ou de parte dele (LENGAUER *et al.*, 1998).

Ao contrario de muitas características adquiridas por células de câncer, a instabilidade genômica, uma vez adquirida pela célula, não oferece vantagem imediata para a proliferação ou sobrevivência. No entanto, em longo prazo esta instabilidade favorece mutações adicionais consideradas essenciais ou não para a proliferação agressiva do clone de células que a possui (WEINBERG, 2000). Esta informação permite supor que a correlação encontrada entre as alterações do gene *RAPH1* e os genes das colinesterases seria devido à instabilidade genômica, que pode ocorrer no desenvolvimento de qualquer tumor em crescimento, tornando-a responsável por causar as alterações descritas neste trabalho e no trabalho de BERNARDI *et al.*, (2010), e não uma relação direta entre ampliações e deleções destes genes com o processo de tumorigênese.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, pôde-se concluir que:

1. O gene *RAPH1* encontra-se alterado (amplificado ou deletado) em todas as amostras de carcinoma mamário analisadas.
2. As alterações estruturais encontradas para o gene *RAPH1* não apresentam correlação significativa com os dados clínico - histopatológicos das pacientes e nem podem ser consideradas como um fator preditivo para alguma destas características.
3. As ampliações e deleções do gene *RAPH1* não contribuem de maneira efetiva para o processo de tumorigênese e nem para o aumento ou diminuição da motilidade celular e incidência de metástase nos linfonodos em carcinoma mamário.

8 REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2010**. Atlanta: American Cancer Society, 2010. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-026238.pdf>
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-Time PCR Vs. Traditional PCR**. Tutorial.
- APPLIED BIOSYSTEMS: Quantifiler kits. São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/7j2orxf7.pdf>. Acesso em 28/07/2011.
- APPLIED BIOSYSTEMS: Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, 2008.
- BAE, Y.H; DING, Z; ZOU, L; WELLS, A; GERTLER, F; ROY, P. Loss of Profilin-1 expression enhances Breast Cancer Cell motility by Ena/VASP Proteins. **J.Cell.Physiol.** **219**, p. 354-364, 2009.
- BAE, Y.H; DING, Z; DAS, T; WELLS, A; GERTLER, F; ROY, P. Profilin1 regulates PI(3,4)P₂ and lamellipodin accumulation at the leading edge thus influencing motility of MDA-MB-231 cells. **PNAS** **107**, p. 21547-21552, 2010.
- BASELGA, J; TRIPATHY, D; MENDELSON, J; BAUGHMAN, S; BENZ, C. C; DANTIS, L; SKLARIN, N. T; SEIDMAN, A. D; HUDIS, C. A; MOORE, J; ROSEN, P. P; TWADDELL, T; HENDERSON, I. C; NORTON, L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185^{HER2} monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, **14**, p. 737-744, 1996.
- BEDER, L.B; GUNDUZ, M; OUCHIDA, M; FUKUSHIMA, K; GUNDUZ, E; ITO, S; SAKAI, A; NAGAI, N; NISHIZAKI, K; SHIMIZU, K. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. **Lab Invest** **83**, p. 99 –105, 2003.
- BERNARDI, C.C; RIBEIRO, E.S.F; CALALLI, I.J; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E; SOUZA, R.L.R. Amplification and deletion of the *ACHE* and *BCHE* cholinesterase genes in sporadic breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, **197**, p. 158-165, 2010.
- BIÈCHE, I.; CHAMPEME, M. H.; MATIFAS, F.; CROPP, C. R.; CALAHAN, R.; LIDEREAU, R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 53, p. 1950-1994, 1993.
- BOGLIOLO, L. **Patologia**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.637-638, 2006.
- BOUKHELIFA, M; PARAST, M.M; BEAR, J.E; GERTLER, F.B; OTEY, C.A. Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. **Cell Motil Cytoskeleton** **58**, p. 17–29, 2004.

- BRADLEY, W.D; KOLESKE, A.J. Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: Emerging mechanisms and physiological contexts. **J. Cell Sci.** **122**, p. 3441–3454, 2009.
- BRAY, F; MCCARRON, P; PARKIN, D.M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Res.** **6**, p. 229-39, 2004.
- BUERGER, H.; OTTERBACH, F.; SIMON, R.; SCHAFER, K.L.; POREMBA, C.; DIALLO, R.; BRINKSCHMIDT, C.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; BOECKER, W. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. The **Journal of Pathology, Londres**, **v.189**, n.4, p.521-526, 1999.
- BURDALL, S.E.; HANBY, A.M.; LANSDOWN, M.R.; SPEIRS, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Research**, v.5, p.89-95, 2003.
- CARRAWAY, K.L.; CAROTHERS CARRAWAY, C.A.; CARRAWAY K.L III. Roles of ErbB-3 and ErbB-4 in the physiology and pathology of the mammary gland. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia** **2**, p. 187–198, 1997.
- CHARAMES G.S; BAPAT, B. Genomic instability and cancer. **Curr Mol Med**, vol 3, p. 589-596, 2003.
- CLEMONS, M; DANSON, S; HOWELL, A. Tamoxifen ('Nolvadex'): a review. **Cancer Treatment Reviews** **28**, p. 165–180, 2002.
- COOPER, G.M. Elements of Human Cancer. Jones and Bartlett Publishers, 1992.
- CIPOLLINI, G.; TOMMASI, S.; PARADISO, A.; ARETINI, P.; BONATTI, F.; BRUNETTI, I.; BRUNO, M.; LOMBARDI, G.; SCHITTULLI, F.; SENSI, E.; TANCREDI, M.; BEVILACQUA, G.; CALIGO, M.A. Genetic alterations in hereditary breast cancer. **Ann Oncol.** Vol. 15, p. 7 – 13, 2004.
- CHANG, C.; ADLER, C.E; KRAUSE, M; CLARK, S.G; GERTLER, F.B; TESSIER-LAVIGNE, M; BARGMANN, C.I. MIG-10/Lamellipodin and AGE-1/PI3K Promote Axon Guidance and Outgrowth in Response to Slit and Netrin. **Curr Biol** **16**, p. 854–862, 2006.
- DAHL, E; SADR-NABAVI, A; KLOPOCKI, E; BETZ, B; GRUBE, S., KREUTZFELD, R. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. **Journal of Pathology**, **205**: 21–28, 2005.
- DALY, R.J. The Grb7 family of signalling proteins. **Cell Signal**, **10**, p. 613-18, 1998.
- DI MODUGNO, F; DEMONTE, L; BALSAMO, M; BRONZI, G; NICOTRA, M.R; ALESSIO, M. Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena+11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena+11a phosphorylation in breast cancer cell lines. **Cancer Res** **67**, p. 2657–2665, 2007.
- DONG, J-T. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews** **20**, p. 173–193, 2001.

DORAK, M.T. Real-Time PCR (advanced methods series). Oxford: Taylor & Francis, 2006. Disponível em: <<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>>.

DeFELICE, E.A. Breast Cancer: Web Resource Guide for Consumers, Healthcare Providers, Patients, and Physicians. Editora iUniverse, 2002. Disponível em: <<http://books.google.com/books>> Acesso em: 08/2010.

DREES, F; GERTLER, F.B. Ena/VASP: Proteins at the tip of the nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol.** **18**, p.53–59, 2008.

EASTON, D.F; NAROD, S.A ; FORD, D. The genetic epidemiology of BRCA1. **Breast Cancer Linkage Consortium**, 1994.

EPPERT, K.; WUNDER, J. S; ANELIUNAS, V.; TSUI, L.; SCHERER, S. W.; ANDRULIS, I. L. Altered expression and deletion of RMO1 in osteosarcoma. **Int. J. Cancer** v. 114, p. 738–746, 2005.

EUROGENTEC. **qPCR Guide**. Tutorial.

FEKJÆR, H. W; LINDQVIST, B.H; VATTEN, L.J; AALEN, O.O; TRETLLI, S. Breast cancer tumor growth estimated through mammography screening data. **Breast Cancer Research**, v. **10**, 2008.

FORD, D; EASTON, D.F; PETO, J. Estimates of the gene frequency of *BRCA1* and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. **Am J Hum Genet** **57**, p. 1457–1462, 1995.

FOROZAN, F.; MAHLAMÄKI, E.H.; MONNI, O.; CHEN, Y.; VELDMAN, R.; JIANG, Y.; GOODEN, G.C.; ETHIER, S.P.; KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. **Cancer Research, Chicago**, v.**60**, n.16, p.4519-4525, 2000.

FUTREAL,P.A; COIN. L; MARSHALL,M; DOWN, T; HUBBARD, T; WOOSTER, R; RAHMAN, N; STRATTON, M.R. A census of human cancer genes. **Nature Reviews Cancer** v. **04**, p. 177-183, 2004.

GERTLER, F; CONDEELIS, J. Metastasis: tumorcellsbecoming MENAcing. **Trends Cell Biol.** **21**, p. 81-90, 2011.

GOICOECHEA, S.M; BEDNARSKI, B; GARCIA-MATA, R; PRENTICE-DUNN, H; KIM, H.J; OTEY, C.A. Palladin contributes to invasive motility in human breast cancer cells. **Oncogene** **28**, p. 587–598, 2009.

GOLDHIRSCH, A; WOOD, W.C; GELBER, R.D. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy for early breast cancer. **J Clin Oncol** v. **21**, p. 3357–3365, 2003.

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

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. *Introdução a Genética*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GROSSE, R; COPELAND, J.W; NEWSOME, T.P; WAY, M; TREISMAN, R. A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. **EMBO J.** **22**, p. 3050–3061, 2003.

HAN, D.C; GUAN, J.L. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. **J Biol Chem**, **274**, p. 24425–30, 1999.

HAN, D.C; SHEN, T.L; GUAN, J.L. Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. **J Biol Chem**, **275**, p. 28911–17, 2000.

HAN, D.C; SHEN, T.L; GUAN, J.L. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. **Oncogene**, **20**, p. 6315 – 21, 2001.

HAN, D.C; SHEN, T.L; MIAO, H; WANG, B; GUAN, J.L. EphB1 associates with Grb7 and regulates cell migration. **J Biol Chem**, **277**, p. 45655– 61, 2002.

HANAHAHAN, D; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, **100**, p. 57–70, 2000.

HUNT, K.K.; ROBB, G.L.; STROM, E.A.; UENO, N.T. Breast Cancer. The MD Anderson Cancer Care Series, p.56, 2001. Disponível em : <<http://books.google.com/books>> Acesso em Agosto de 2010.

HANSEN, M.F. Molecular Genetic Considerations in Osteosarcoma. **Molecular Genetics of Osteosarcoma**, vol. **270**, p. 237-246, 1991.

HONRADO, E.; BENITEZ, J.; PALACIOS, J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. **Modern Pathology**. Vol. 18, p. 1305-1320, 2005.

HYMAN, E; KAURANIEMI,P; HAUTANIEMI,S; WOLF, M; MOUSSES, S; ROZENBLUM, E. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. **Cancer Res.** **62**, p. 6240–6245, 2002.

IDT. Disponível em: <http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2011.

JAHN, T; SEIPEL, P; URSCHEL, S; PESCHEL, C; DUYSSTER, J. Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. **Mol Cell Biol**, **22**, p. 979-91, 2002.

KAMANGAR, F; DORES, G.M; ANDERSON, W.A. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. **J. Clin. Oncol.**, **24**, p. 2137-2150, 2006.

KAUFMANN, N; WILLS, Z.P; VAN VACTOR, D. *Drosophila* Rac1 controls motor axon guidance. **Development** **125**, p. 453–461, 1998.

KNUDSON, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc. Nat. Acad. Sci.** Vol. 68, no. 4, p. 820-823, 1971.

KÖNIGSHOFF, M.; WILHELM, J.; BOHLE, R.M.; PINGOUD, A.; HAHN, M. *HER-2/neu* gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.49, n.2, p.219-229, 2003.

KRAUSE, M; DENT, E.W; BEAR, J.E; LOUREIRO, J.J; GERTLER, F.B. Ena/VASP proteins: Regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** **19**, p. 541–564, 2003.

KRAUSE, M; LESLIE, J.D; STEWART, M; LAFUENTE, E.M; VALDERRAMA, F; JAGANNATHAN, R; STRASSER, G.A; RUBINSON, D.A; LIU, H; WAY, M. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. **Dev. Cell** **7**, p. 571–583, 2004.

KVITKO, K. A Carcinogênese e seus Agentes In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

LAFUENTE, E.M; VAN PUIJENBROEK, A.A.F.L; KRAUSE, M; CARMAN, C.V; FREEMAN, G.J; BEREZOVSKAYA, A; CONSTANTINE, E; SPRINGER, T.A; GERTLER, F.B; BOUSSIOTIS, V.A. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and Mediates Rap1-Induced Adhesion. **Dev. Cell**, **Vol. 7**, p. 585–595, 2004.

LAMBE, M; HSIEH, C.C; CHAN, H.W; EKBOM, A; TRICHOPOULOS, D; ADAMI, H.O. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-2. based study in Sweden. **Breast Cancer Res Treat** **38** p. 305-11, 1996.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, Londres, v.6, n.62, 2005.

LEGG, J. A.; MACHESKY, L. M. MRL proteins: Leading Ena/VASP to Ras GTPases. **Nature Cell Biology**, v. 6 . p.1015-1017, 2004.

LENGAUER,C; KINZLER, K.W; VOGELSTEIN, B. Genetics instabilities in human cancer. **Nature**, **vol 396**, p.643-649, 1998.

LYNG, M.B; LÆNKHOLM, A.K; PALLISGAARD, N; DITZEL, H.J. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. **BMC Cancer**, **8:20**, 2008.

LYULCHEVA, E; TAYLOR, E; MICHAEL, M; VEHLLOW, A; TAN, S; FLETCHER, A; KRAUSE, M; BENNETT, D. *Drosophila* Pico and Its mammalian ortholog Lamellipodin activate Serum Response Factor and promote cell proliferation. **Dev. Cell** **15**, p. 680 – 690, 2008.

LODISH, H; BERK, A; MATSUDAIRA,P; KAISER, C.A; KRIEGER, M; SCOTT,M.P; ZIPURSKY; DARNELL. *Biologia Celular e Molecular*. 5 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005.

LOURO, I. D.; LLERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**. 2 ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002

LUNDQUIST, E.A; REDDIEN, P.W; HARTWIEG, E; HORVITZ, H.R; BARGMANN, C.I. Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. **Development** **128**, p. 4475–4488, 2001.

MACMAHON, B; COLE, P; LIN, T.M; LOWE, C.R; MIRRA, A.P; RAVNIHAR, B. Age at first birth and breast cancer risk. **Bull World Health Organ** **3**, p. 209-21, 1970.

MANSER, J; ROONPRAPUNT, C; MARGOLIS, B. *C. elegans* cell migration gene mig-10 shares similarities with a family of SH2 domain proteins and acts cell nonautonomously in excretory canal development. **Dev Biol**, **184**, p. 150–64, 1997.

MANSER, J; WOOD, W.B. Mutations affecting embryonic cell migrations in *Caenorhabditis elegans*. **Dev Genet**, **11**, p.49–64, 1990.

MARTY, M, COGNETTI, F; MARANINCHI, D. Efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: results of a randomized phase II trial by the M77001 study group. **J Clin Oncol** **v.23**, p. 4265–4274, 2005.

MATUHARA, A. M; NAGANUMA, M. Manual instrucional para aleitamento materno de recém-nascidos pré-termo. **Pediatria (São Paulo)** **28**, p. 81-90, 2006.

MICHAEL, M; VEHLLOW, A; NAVARRO, C; KRAUSE, M. c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP Proteins Cooperate in Dorsal Ruffling of Fibroblasts and Axonal Morphogenesis.**Curr. Biol.** **20**, P. 1-9, 2010.

MORSE, D.L; CARROLL, D; WEBERG, L; BORGSTROM, M.C; RANGER-MOORE, J; GILLIES, R.J. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Anal. Biochem.** **342** p. 69–77, 2005.

MYLLYKANGAS, S.; KNUUTILA, S. Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. **Cancer Letters, Amsterdã**, **v.232**, p.79-89, 2006.

NAGASE, T.; KIKUNO, R.; HATTORI, A.; KONDO, A.; OKUMURA, K.; OHARA, O. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIX. The complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. **Dna Research** **7**,p. 347-355, 2000.

NARAYAN, G; PULIDO, HÁ; KOUL, S; LU, XY; HARRIS, C.P; YEH, Y.A; VARGAS, H; POSSOM H; TERRY, M.B; GISSMANN, L; SCHNEIDER, A; MANSUKHANI, M. Genetic

analysis identifies putative tumor suppressor sites at 2q35– q36.1 and 2q36.3– q37.1 involved in cervical cancer progression. **Oncogene** **22**, p.3489 –99, 2003.

NG, J; NARDINE, T; HARMS, M; TZU, J; GOLDSTEIN, A; SUN, Y; DIETZL, G; DICKSON, B.J; LUO, L. Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. **Nature** **416**, p. 442–447, 2002.

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

OLDENBURG, R.A.; KROEZE-JANSEMA, K.; MEIJERS-HEIJBOER, E.J; VAN ASPEREN, C.J.; HOOGERBRUGGE, N.; LEEUWEN, I.; VASEN, H.F.; CLETON-JANSEN, A.M.; KRAAN, J.; HOUWING-DUISTERMAAT, J.J.; MORREAU, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Characterization of familial non-*BRCA1/2* breast tumors by loss of heterozygosity and immunophenotyping. **Clin Cancer Res.** Vol.12, p. 1693–1700, 2006.

OLIVEIRA, M.M.C. **Análise de perda de heterozigose no braço curto do Cromossomo 3 (3p) em pacientes com Carcinoma Mamário Esporádico.** 94 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2008.

OLIVEIRA, S.F.V. **Análise de perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 9 (9p) em pacientes com carcinomas primários de mama.** 147 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2008.

OTSUKA, T; KOHNO, T; MORI, M; NOGUCHI, M; HIROHASHI, S; YOKOTA, J. Deletion mapping of chromosome 2 in human lung carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** **16**, p. 113–9, 1996.

PACK, S.D; KARKERA, J.D; ZHUANG, Z; PAK, E.D; BALAN, K.V; HWU, P; PARK, W.S; PHAM, T; AULT, D.O; GLASER, M; LIOTTA, L; DETERA-WADLEIGH, S.D. Molecular cytogenetic fingerprinting of esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization reveals a consistent pattern of chromosomal alterations. **Genes Chromosomes Cancer** **25**, p. 160–8, 1999.

PEGRAM, M. D; LIPTON, A; HAYES, D. F; WEBER, B. L; BASELGA, J. M; TRIPATHY, D; BALY, D; BAUGHMAN, S. A; TWADDELL, T; GLASPY, J. A; SLAMON, D. J. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. **J. Clin. Oncol.**, **16**, p. 2659-2671, 1998.

POSERN, G; TREISMAN, R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. **Trends Cell Biol.** **16**, p. 588–596, 2006.

PRITCHARD, K. Predictive molecular markers: hormone receptor status. Program and abstracts of the 3rd International BCIRG Conference. Los Angeles, 2002.

POLLACK, J.R; SORLIE, T; PEROU, C.M; REES, C.A; JEFFREY, S.S.; LONNING, P.E. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the

transcriptional program of human breast tumors. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** vol. **99**, p. 12963–12968, 2002.

PUJANA, M.A.; HAN, J.J.; STARITA, L.M.; KRISTEN N STEVENS, K.N.; TEWARI, M.; AHN, J.S.; RENNERT, G.; MORENO, V.; KIRCHHOFF, T.; GOLD, B.; ASSMANN, V.; ELSHAMY, W.M.; RUAL, J.F.; LEVINE, D.; ROZEK, L.S.; GELMAN, R.S.; GUNSALUS, K.C.; GREENBERG, R.A.; SOBHIAN, B.; BERTIN, N.; VENKATESAN, K.; AYIVI-GUEDEHOUSOU, N.; SOLÉ, X.; HERNÁNDEZ, P.; LÁZARO, C.; NATHANSON, K.L.; WEBER, B.L.; CUSICK, M.E.; HILL, D.E.; OFFIT, K.; LIVINGSTON, D.M.; GRUBER, S.B.; PARVIN, J.D.; VIDAL, M. Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. **Nature Genetics**, Nova lorque, v.39, p.1338-1349, 2007.

PULA, G; KRAUSE, M. Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease. **Handb Exp Pharmacol** **186**, p. 39–65, 2008.

QUINN, C.C; PFEIL, D.S; CHEN, E; STOVALL, E.L; HARDEN, M.V; GAVIN, M.K; FORRESTER, W.C; RYDER, E.F; SOTO, M.C; WADSWORTH, W.G. UNC-6/netrin and SLT-1/slit guidance cues orient axon outgrowth mediated by MIG-10/RIAM/lamellipodin. **Curr. Biol.** **16**, p. 845–853, 2006.

QUINN, C.C;. PFEIL, D.S; WADSWORTH, W.G. CED-10/Rac1 mediates axon guidance by regulating the asymmetric distribution of MIG- 10/Lamellipodin. **Curr. Biol.** **18**. p. 808-813, 2008.

RODRIGUEZ-VICIANA, P.; SABATIER, C; MCCORMICK, F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. **Mol. Cell. Biol.** **24**, p. 4943–4954, 2004.

ROY, P; JACOBSON, K. Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. **Cell Motil Cytoskeleton** **57**, p. 84–95, 2004.

SALAZAR, M.A; KWIATKOWSKI, A.V; PELLEGRINI, L; CESTRA, G; ROSSMAN, M.H; SERNA, K.L; SONDEK, D.M; GERTLER, F.B; DE CAMILLI, P. Tuba: a novel protein containing Bin/Amphiphysin/ Rvs (BAR) and Dbl homology domains links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. **J. Biol. Chem.** **278**, p. 9031–49043, 2003.

SCHWA, M. Oncogene amplification in solid tumors. **Cancer Biology**, Vol 9, p. 319-325, 1999.

SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the ERBB2-2/neu oncogene. **Science**, Washington, v.235, n.4785, p.177-82, 1987.

SLAMON D,J. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. **Cancer Invest** **8**, 1990.

SLAMON, D; LEYLAND-JONES, B; SHAK, S; PATON, V; BAJAMONDE, A; FLEMING, T; EIERMANN, W; WOLTER, J; BASELGA, J; NORTON, L. Addition of Herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled Phase III trial (meeting abstract). **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, **17**, 1998.

SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v.28, p.453-483, 1996.

SNUSTAD, D.P; SIMMONS, M.J. Fundamentos de Genética. 4ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008.

SOTIROPOULOS, A; GINEITIS, D; COPELAND, J; TREISMAN, R. Signalregulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. **Cell** **98**, 159–169, 1999.

STEPHENSON, J.; CZEPULKOWSKI, B.; HIRST, W.; MUFTI, G.J. Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). **Leukemia Research**, v.20, p.235-241, 1996.

STRICKLAND,P. Slit2 and netrin1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. **Development** **133**, p. 823–832, 2006.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutation research**, Amsterdam, v. 402, p. 7-14, 1998.

TAKITA, J; YANG, HW; CHEN, YY; HANADA, R; YAMAMOTO, K; TEITZ, T; KIDD, V; HAYASHI Y. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. **Oncogene** **20**, p. 4424–32, 2001.

TAYLOR, B.S; BARRETINA,J; SOCCI, N.D; DECAROLIS, P; LADANYI, M; MEYERSON, M; SINGER,S; SANDER, C. Functional Copy-Number Alterations in Cancer. **PLoS ONE** v. **3**, 2008.

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**. Vol. 9, No. 3, 2004.

THOMPSON, J.D, HIGGINS, D.G, GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Vol. 22, No. 22, p. 4673-4680, 1994.

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

VECCHIONE, A; MARCHESE, A; HENRY, P; ROTIN, D; MORRIONE, A. The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. **Mol Cell Biol**, **23**, p. 3363–72, 2003.

VENKITARAMAN, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**. Vol. 108, p. 171 – 182, 2002.

VOGT, U; BIELAWSKI, K; SCHLOTTER, C.M; BOSSE, U; FALKIEWICZ, B; PODHAJSKA, A.J. Amplification of *erbB-4* oncogene occurs less frequently than that of *erbB-2* in primary human breast cancer. **Gene** **223**, p. 375–380, 1998.

YAMAMOTO, N; MIZOEM J; NUMASAWAM H; TSUJIIM H; SHIBAHARAM T; NOMAM, H. Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** **39**, p. 796–805, 2003.

YAMAZAKI, D; KURISU, S; TAKENAWA, T. Regulation of cancer cell motility through actin Reorganization. **Cancer Sci vol 96- 7**, p. 379–386, 2005.

WANG, W; GOSWAMI, S, SAHAI, E; WYCKOFF, J.B; SEGALL, J.E; CONDEELIS, J.S. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. **Trends Cell Biol** **15**, p. 138–145, 2005.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, Washington, v. 254, p. 1138-1146, 1991.

WEINBERG, R.A. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WINNER, E; MORROW, M; OSBORNE, C; HARRIS, J. Principles and Practice of Oncology. 6ed.. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

WITKE, W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. **Trends Cell Biol** **14**, p. 461–469, 2004.

WITTENMAYER, N; JANDRIG, B; ROTHKEGEL, M; SCHLUTER, K; ARNOLD, W; HAENSCH, W. Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. **Mol Biol Cell** **15**, p. 1600–1608, 2004.

WOLF, S; MOUSSES, S; HAUTANIEMI, S; KARHU, R; HUUSKO, P; ALLINEN, M. High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: Impact of copy number on gene expression, **Neoplasia** **6**, p. 240–247, 2004.

ZAKUT, H.; EHRLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SEIDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **The Journal of Clinical Investigation**, v.86, p.900–908, 1990.

ANEXO

Amplificação e Deleção do gene *RAPH1* e sua correlação com dados clínico-histopatológicos em pacientes com câncer de mama

Meire Batistela • Dellyana Boberg •
 Fabiana Andrade • Enilze de S.F. Ribeiro •
 Iglénir J. Cavalli • Ricardo L.R. Souza

Resumo

Revisão. A proteína Lamelipodina, codificada pelo gene *RAPH1*, modula a montagem do citoesqueleto de actina, através de sua ligação às proteínas Ena/VASP, e atua na protrusão lamelipodial e motilidade celular. A região do gene *RAPH1* (2q33) está deletada em diversos tipos de cânceres e a expressão do gene alterada em tumores quando comparada a tecidos normais. Desse modo foram investigadas amplificações e deleções do gene *RAPH1* em amostras de carcinoma mamário, com o objetivo de determinar sua possível relação com a tumorigênese e metástase.

Métodos. Foram utilizadas amostras de tumor e de sangue periférico de 52 pacientes. As alterações do gene *RAPH1* foram determinadas pela quantificação relativa, método da curva padrão, utilizando a técnica PCR em Tempo Real. Foram realizadas análises de regressão e correlação entre as amplificações e deleções do gene *RAPH1* e dados clínico – histopatológicos.

Resultados. Das 52 amostras analisadas, observou-se 63,5% casos de deleção e 36,5% casos de amplificação. As análises de regressão e correlação com as informações clínico-histopatológicas não apresentaram resultados significativos.

Conclusões. As alterações estruturais do gene *RAPH1* não exercem papel determinante no processo de tumorigênese em carcinomas mamários e as amplificações e deleções encontradas também não são responsáveis por aumentar ou diminuir a motilidade celular e a incidência de metástase nos linfonodos, podendo outras proteínas relacionadas ao processo de metástase estarem envolvidas de

maneira mais efetiva, entre elas a Profilina1 e a Palladina.

Palavras-chave: Lamelipodina, gene *RAPH1*, amplificação e deleção gênica, Câncer de mama, PCR em Tempo Real.

1 Introdução

Nas últimas décadas têm ocorrido em todo o mundo significativo aumento da incidência do câncer de mama e conseqüentemente da mortalidade associada à neoplasia. O desenvolvimento da malignidade é o resultado da interação de fatores genéticos com estilo de vida, hábitos reprodutivos e meio ambiente [14]. O gene *RAPH1* (Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1), é responsável por produzir a proteína Lamelipodina humana (Lpd). A ligação desta proteína às proteínas Ena/VASP auxilia a montagem do citoesqueleto de actina [17, 16], e desempenha uma importante função na protrusão lamelipodial e na motilidade celular. Já foi mostrado que a proteína Lpd funciona como mediadora contribuindo para um aumento de motilidade celular in vitro, em células de câncer de mama (MDA-MB-231), na ausência da proteína Profilina1 [2]. Outros trabalhos já mostraram que a região em que se encontra o gene *RAPH1* (2q33) está deletada em diversos tipos de cânceres, entre eles: carcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de boca, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células escamosas do esôfago, neuroblastoma e câncer de pulmão [21, 31, 26, 3, 22]. Além de o gene já ter sido descrito como estando menos expresso em

alguns tipos de cânceres, entre eles cânceres de ovário e mama [6].

Considerando a importância de amplificações e deleções gênicas na origem e progressão dos tumores humanos [24, 8] objetivamos investigar tais alterações no gene *RAPH1* a fim de determinar seu envolvimento no processo de tumorigênese e metástase.

2 Material e Métodos

2.1 Caracterização da Amostra

Foram utilizados fragmentos de tumores de mama juntamente com amostras de sangue periférico (utilizadas como controle) coletadas pela equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, de 52 pacientes portadoras de carcinomas mamários esporádicos atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas de Curitiba, Paraná, Brasil, totalizando 104 amostras. Foram coletados cerca de 10 ml de sangue periférico de cada paciente, por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. O material foi imediatamente colocado em tubos estéreis contendo 1,75 ml de solução anti-coagulante-ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o processamento. Já as amostras do tecido tumoral foram removidas cirurgicamente, avaliadas por um patologista para a confirmação da malignidade e devidamente acondicionadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C) até a extração do DNA. A classificação histopatológica foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela classificação internacional de tumores (WHO) e o estadiamento clínico foi determinado de acordo com o estadiamento TNM do câncer. O DNA do sangue periférico foi extraído pelo método *salting out* e o DNA do tecido tumoral pelo método Fenol-Clorofórmio. Todas as amostras foram aliqüotadas a uma concentração de 20ng/µl.

2.2 Amplificação por qPCR

Para a análise da alteração do número de cópias do gene *RAPH1*, foi utilizada a técnica PCR em Tempo Real e as reações de amplificação foram realizadas utilizando-se sondas TaqMan® como método de detecção e Master MIX *QuantiFast® Probe* PCR, utilizando o equipamento Mastercycler® ep realplex em uma placa de 96 poços, com volume final de 10 µl. Todas as sequências de primers e probes foram desenhadas com auxílio da ferramenta IDT *Scitools Real Time PCR*. As sequências do gene alvo *RAPH1*, assim como dos genes de referência escolhidos, Pumilio Homólogo 1 (*PUM1*), *18S* e β-actina (*ACTB*) [19, 18] utilizadas estão descritas na Tabela 1. A amplificação dos segmentos, realizada pela PCR em tempo real, foi analisada por meio da Quantificação Relativa, método da curva padrão. Cada placa foi realizada para um gene em separado, contendo: a curva padrão, 13 amostras de tumor e sangue em triplicata e um controle negativo, também em triplicata, foram utilizados os valores obtidos para as amostras somente se o desvio entre os Cts das triplicatas fosse $\leq 0,3$. A curva padrão foi construída em todas as placas, com 5 pontos em triplicata, fator de diluição 4 nas seguintes concentrações: 256 ng/µl, 64 ng/µl, 16 ng/µl, 4 ng/µl e 1 ng/µl, estando suas eficiências variando de 100 a 101%. O ciclo de amplificação utilizado foi: 1) 95°C por 3 minutos, 2) 95°C por 50 segundos, 3) 59.8°C por 30 segundos, 4) 72°C por 30 segundos, 5) passos 2 a 4 repetidos por 45 ciclos.

2.3 Análises estatísticas

Para cada amostra a quantidade, em nanogramas, do gene alvo (*RAPH1*) e dos genes de referência (*18S*, *PUM1* e *ACTB*) tanto em tecido tumoral quanto em tecido sanguíneo foi determinada pelo *Software Realplex 1.5 Eppendorf*. Em seguida, foi calculada a relação (Q) para cada amostra utilizando-se as médias das quantidades obtidas das reações de amplificação do gene alvo e genes de referência, nos dois tecidos.

Tabela 1 – Iniciadores e sondas utilizadas nas reações de amplificação do gene alvo e dos genes de referência

Gene	Exon	Iniciador avante	Sonda	Iniciador reverso
<i>18S</i>	-	5' GAGACTCTGGCATGCTAACTAG 3'	5' TGCTCAATCTCGGGTGGCTGAA 3'	5' GGACATCTAAGGGCATCACAG 3'
<i>PUM1</i>	15	5' ACGAATGGCAGTGGAAGATAC 3'	5' TGAAGCCAAGTACCGCAGTGCAA 3'	5' CGAGAGGAAGAGAAAAGAGTGC 3'
<i>ACTB</i>	6	5' AGTCCCTTGCCATCCTAAAAG 3'	5' CCAGTCCTCTCCCAAGTCCACAC 3'	5' CAATGCTATCACCTCCCCTG 3'
<i>RAPH1</i>	4	5' TCTTTGAGTATGGATGAGGCTG 3'	5' TGACGCGTTCTTCTGTGCTGATT 3'	5' GTGATGCTGGAATGGGAGG 3'

O valor relativo de Q foi obtido separadamente para o gene alvo e para cada gene de referência a partir da fórmula (1) [15].

Tabela 2 – Características clínico-histopatológicas das pacientes

Características	Nº de pacientes,(%)	N (total)
Idade da paciente (anos) ^a		
<60	25 (57)	44
≥60	19 (43)	
Tamanho do tumor (mm)		
5-24	15(36,6)	
25-44	19(46,3)	41
45-64	4(9,8)	
65-84	3(7,3)	
Grau do Tumor		
I	7(16,3)	43
II	26(60,4)	
III	10(23,3)	
Metástase dos Linfonodos Axilares	24(57,1)	42
Amplificação <i>HER2</i>	5(14,7)	34
Receptores de Estrogênio	29(85,3)	34
Receptores de Progesterona	27(81,8)	33
Patologia		
Ductal	39(81,3)	48
Lobular	2(4,2)	
Tubular	2(4,2)	
Outros	5(10,3)	

^aCaracterística disponível porém não utilizada nas análises

$$Q = \frac{\text{Tumor (Alvo)}}{\text{Tumor (Referência)}} / \frac{\text{Sangue (Alvo)}}{\text{Sangue(Referência)}} \quad (1)$$

Os coeficientes de variação (CV) foram calculados a partir das triplicatas dos tumores do gene alvo e dos tumores dos genes de referência para obter o desvio padrão (S) de Q para cada amostra, (2) [1].

$$CV_1 = \frac{\text{Desvio Padrão Tumor (Alvo)}}{\text{Média Tumor (Alvo)}}$$

$$CV_2 = \frac{\text{Desvio Padrão Tumor (Referência)}}{\text{Média Tumor (Referência)}}$$

$$CV = (CV_1^2 + CV_2^2)^{1/2}$$

$$S = CV \cdot Q \quad (2)$$

Para determinar o tipo de alteração (amplificação ou deleção) de cada amostra foi feito uma média dos valores de Q, assim como uma média dos valores de desvio (S) utilizando dois genes de referência com resultados concordantes (Tabela 4) e verificado se $Q_{(\text{médio})} \pm S_{(\text{médio})} > 1$ (amostras amplificadas) ou $Q_{(\text{médio})} \pm S_{(\text{médio})} < 1$ (amostras deletadas), com I.C de 95%. Foram realizadas análises de regressão e correlação entre os resultados obtidos e os dados clínico-histopatológicos (Tabela 2) com auxílio do programa *SPSS Statistics 17.0* (Windows & Mac).

3 Resultados

3.1 Amplificações e deleções do gene *RAPH1*

O gene *RAPH1* apresentou alteração em todas as amostras analisadas (63,5% deleções vs.

36,5 % amplificações $p=0,0522$) (Tabelas 3 e 4). Com o objetivo de avaliar se as alterações no gene *RAPH1* estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de tumores de mama, com ênfase para o processo de metástase, foram realizados testes de regressão com os dados das características clínico-histopatológicas e alterações do gene *RAPH1* (0= deletado e 2=amplificado) e de correlação entre os valores relativos de Q, e as mesmas características. Nenhum dos valores obtidos foram estatisticamente significantes.

4 Discussão

O gene *RAPH1* está deletado em grande parte das amostras analisadas neste estudo (63,5%, N=52). Este resultado está de acordo com os descritos na literatura para os quais a região do gene *RAPH1* (2q33) está deletada em cânceres de células escamosas de boca, cervicais, de células escamosas de cabeça e pescoço, de células escamosa do esôfago, neuroblastoma e de pulmão [21, 31, 26, 3, 22]. A deleção frequente desta região em cânceres e conseqüentemente do gene *RAPH1* poderia explicar a diminuição da sua expressão observada por Dahl et al. [6] em 43% das amostras de cânceres de mama e 25% em amostras de câncer de ovário. Resultados encontrados por Eppert et al. [9] mostram uma frequência de 67% de Perda de Heterozigose (LOH) do gene *RAPH1* em amostras de osteossarcomas primários assim como uma diminuição da expressão do gene quando comparadas amostras de tumores primários e metastáticos (pareadas), sugerindo uma possível importância do gene tanto para o desenvolvimento da doença, uma vez que ele encontra-se deletado em tumores primários, quanto para a progressão de tumores primários para tumores metastáticos, por apresentar mecanismos de diminuição da expressão gênica. De maneira geral, para osteossarcomas, é possível que o gene *RAPH1* possua um efeito protetor, desempenhado por muitos genes chamados supressores de tumor, por supor que sua deleção ou diminuição da expressão possa ser importante para conceder vantagens ao tumor em crescimento ou permitir que as células se

tornem metastáticas. O mesmo não foi observado para as amostras de carcinoma mamário, na qual as alterações do gene *RAPH1* não se mostraram preditivas para nenhuma das características clínico-histopatológicas analisadas, nem mesmo para metástase nos linfonodos, considerada inicialmente. Uma das justificativas seria o fato de que cada tipo de câncer possui características peculiares de desenvolvimento e progressão e genes de

Tabela 3 – Quantidade relativa do gene *RAPH1* (Q) e o Desvio Padrão (S) em 52 pacientes.

Caso	Q _(médio) ± S _(médio)	Alt	Caso	Q _(médio) ± S _(médio)	Alt
1	0,56147 ±0,0015	del	27	2,14605 ±0,0019	amp
2	1,17344 ±0,0015	amp	28	0,69851 ±0,0060	del
3	0,24823 ±0,0052	del	29	1,93462 ±0,0438	amp
4	1,62702 ±0,0020	amp	30	2,80845 ±0,0008	amp
5	2,36422 ±0,0005	amp	31	0,91323 ±0,0213	del
6	1,22119 ±0,0043	amp	32	1,56423 ±0,0025	amp
7	0,63652 ±0,0017	del	33	1,48014 ±0,0002	amp
8	0,72151 ±0,0133	del	34	2,83062 ±0,0809	amp
9	1,12948 ±0,0012	amp	35	0,62089 ±0,0038	del
10	0,43886 ±0,0071	del	36	0,39137 ±0,0012	del
11	1,51613 ±0,0044	amp	37	0,81604 ±0,0025	del
12	1,83078 ±0,0030	amp	38	0,21365 ±0,0023	del
13	0,59184 ±0,0062	del	39	0,50138 ±0,0078	del
14	0,83126 ±0,0024	del	40	0,11186 ±0,0018	del
15	1,39832 ±0,0150	amp	41	0,84815 ±0,0041	del
16	1,02816 ±0,0004	amp	42	0,2974 ±0,0023	del
17	0,75076 ±0,0078	del	43	0,86615 ±0,0062	del
18	0,63167 ±0,0052	del	44	0,72755 ±0,0018	del
19	0,4467 ±0,0022	del	45	0,66422 ±0,0401	del
20	0,41857 ±0,0055	del	46	0,72304 ±0,0125	del
21	1,63662 ±0,0098	amp	47	0,49782 ±0,0027	del
22	0,16573 ±0,0025	del	48	0,70661 ±0,0223	del
23	0,62394 ±0,0030	del	49	3,56984 ±0,0683	amp
24	0,77356 ±0,0017	del	50	6,29024 ±0,0224	amp
25	0,85011 ±0,0059	del	51	0,16206 ±0,0049	del
26	1,4734 ±0,0062	amp	52	0,32196 ±0,0131	del

Abreviações: Alt - alteração; del – deletado no tumor; amp – amplificado no tumor

Tabela 4 - Genes de referência utilizados para determinar as deleções e amplificações do gene *RAPH1*.

Alterações do gene <i>RAPH1</i>	Genes de referência (Nº,%)			
	<i>18S e PUM1</i>	<i>PUM1 e ACTB</i>	<i>18S e ACTB</i>	Total,%
Deleções	22(66,6)	2(6,1)	9(27,3)	33(63,5)
Amplificações	9(47,4)	4(21,1)	6(31,5)	19(36,5)
				52(100)

importância relevante no processo de tumorigênese em osteossarcomas podem não ser os mesmos envolvidos em câncer de mama, embora existam alguns de importância comum [13, 29, 10, 6]. Considerando a relação da proteína Lpd com motilidade celular e metástase, é possível supor os motivos pelos quais as alterações no gene *RAPH1* não estariam interferindo para um aumento ou diminuição de casos de metástase nos linfonodos. A deleção do gene *RAPH1* poderia resultar, a priori, em uma diminuição da incidência de metástase nos linfonodos, uma vez que a proteína Lpd não estaria disponível para atuar como adaptadora de sinais e promover a montagem do citoesqueleto de actina. No entanto, uma série de outras proteínas estão envolvidas no processo de remodelamento do citoesqueleto de actina e que também atuam no processo de metástase, entre elas: cofilina, Arp 2/3, LASP-1, Mena e Palladina [23, 30, 7, 12] que poderiam estar desempenhando suas funções normalmente mesmo na ausência da Lpd. O trabalho de Gertler *et al.* [11] aponta a importância da proteína Mena (pertencente a família Ena/VASP) como um possível marcador para risco de metástase. Foram encontradas isoformas superexpressas desta proteína responsáveis por aumentar o nível de

protrusão celular e habilidades migratórias, ao mesmo tempo em que outras isoformas estavam seletivamente menos expressas. A mudança de expressão das isoformas permite ao tumor metastizar em resposta a vários estímulos, entre eles o fator EGF. Outras proteínas já foram descritas como associadas à proteína Mena, entre elas as proteínas TES e Palladina [25, 12]. A proteína Palladina possui a mesma capacidade da Lpd em se ligar às proteínas Ena/VASP [4] e também é conhecida por contribuir para a motilidade invasiva de células em câncer de mama. Goicoechea *et al.* [12] mostraram aumento da expressão da proteína Palladina em quatro linhagens de câncer de mama invasivas, além de um importante papel desta proteína na formação de podossomas (estruturas que funcionam para aderir e degradar a matriz extracelular), os quais têm sido encontrados em muitos tipos de células invasivas. O gene *RAPH1* se mostrou amplificado em 36,5% das amostras analisadas. Não existe nenhum trabalho na literatura descrevendo amplificação do número de cópias deste gene, no entanto sua proximidade a proto-oncogenes poderia explicar a amplificação encontrada em alguns tumores [32]. O gene *erbB-4*, da mesma família do gene *erbB-2* (ou *HER2*), relacionado a crescimento, diferenciação e proliferação

de tecidos [5], situa-se na posição 2q34 muito próxima da região em que se localiza o gene *RAPH1* (2q33) e já foi descrito como amplificado em 13,1% de amostras de câncer de mama [27]. Krause *et al.* [16] verificaram aumento de velocidade de protrusão lamelipodial quando a proteína Lpd encontrava-se superexpressa. Desta forma, poderia ser levantada a hipótese de que a amplificação do gene *RAPH1* levaria a um aumento da expressão da proteína Lpd em câncer de mama e que desta forma aumentariam as chances de metástase nos linfonodos pelo aumento da motilidade celular, mesmo sabendo que nem sempre o aumento do número de cópias de um gene determina um aumento significativo da expressão gênica [20]. Uma das possíveis explicações para o não aumento da incidência de metástases apesar da amplificação do gene *RAPH1* e hipoteticamente do aumento da expressão da proteína Lpd, seria o de que existem outras proteínas capazes de regular negativamente e de forma intensa a motilidade celular. BAE *et al.* [2] mostraram que a proteína Profilina1 pode inibir a motilidade celular em células MDA-MB-231 de linhagem de câncer de mama, por se ligar aos mesmos fosfoinosítídeos (PI (3,4)P₂) que a Lpd utiliza para recrutar as proteínas Ena/VASP e induzir a montagem do citoesqueleto de actina. Os sítios indisponíveis para a Lpd impediriam sua atuação a favor da motilidade celular. Da mesma forma quando a proteína Profilina1 está menos expressa, os sítios se tornam livres para que a Lpd atue causando hiperomotilidade. Sendo assim, a presença da proteína Profilina1, neste caso, poderia ser essencial para o não aumento da motilidade celular em células de câncer de mama e o papel da Lpd estaria atenuado. Além das proteínas responsáveis por atuar diretamente no citoesqueleto de actina, existem outros genes responsáveis por codificar outros

componentes que atuam nas vias que fazem com que uma célula adquira a capacidade de migrar [28]. Desta maneira o gene *RAPH1* seria somente mais um componente de inúmeras vias que culminam em aumento de motilidade e metástase e acaba por não apresentar um papel determinante em células de carcinoma mamário, podendo apresentar em outros tipos de câncer uma contribuição mais efetiva.

Referências

1. APPLIED BIOSYSTEMS: Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, 2008.
2. Y.H. Bae, Z. Ding, T. Das; A. Wells, F. Gertler, P. Roy. Profilin1 regulates PI(3,4)P₂ and lamellipodin accumulation at the leading edge thus influencing motility of MDA-MB-231 cells. PNAS **107**, p. 21547-21552, 2010.
3. L.B. Beder, M. Gunduz, M. Ouchida, K. Fukushima, E. Gunduz, S. Ito et al. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. Lab Invest **83**, p. 99 –105, 2003.
4. M. Boukhelifa, M.M. Parast, J.E. Bear, F.B. Gertler, C.A. Otey. Palladin Is A Novel Binding Partner For Ena/VASP Family Members. Cell Motil Cytoskeleton **58**, P. 17–29, 2004.
5. K.L. Carraway, C.A. Carraway, K.L. Carraway III. Roles of erbb-3 and erbb-4 in the physiology and pathology of the mammary gland. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia **2**, p. 187–198, 1997.

6. E. Dahl, A. Sadr-Nabavi, E. Klopocki, B. Betz, S. Grube, R. Kreutzfeld. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Journal of Pathology*, **205**: 21–28, 2005
7. F. Di Modugno, L. Demonte, M. Balsamo, G. Bronzi, M.R. Nicotra, M. Alessio,. Molecular cloning of hmena (ENAH) and its splice variant hmena+11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hmena +11a hosphorylation in breast cancer cell lines. *Cancer Res* **67**, p. 2657–2665, 2007.
8. J-T. Dong. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate câncer. *Cancer and Metastasis Reviews* **20**, p. 173–193, 2001.
9. K. Eppert, J. S. Wunder, V. Aneliunas, L. Tsui, S. W. Scherer, I. L. Andrulis. Altered expression and deletion of RMO1 in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* v. **114**, p. 738–746, 2005.
10. P.A. Futreal, L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman, M.R .Stratton. A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* v. **04**, p. 177-183, 2004.
11. F. Gertler, J. Condeelis. Metastasis: tumorcellsbecoming menacing. *Trends Cell Biol.* **21**, p. 81-90, 2011.
12. S.M. Goicoechea, B. Bednarski, R. García-Mata,H. Prentice-Dunn, H.J. Kim,C.A. Otey. Palladin contributes to invasive motility in human breast cancer cells. *Oncogene* **28**, p. 587–598, 2009.
13. M.F. Hansen. Molecular Genetic Considerations in Osteosarcoma. *Molecular Genetics of Osteosarcoma*, vol. **270**, p. 237-246, 1991.
14. M.C. Johnson-Thompson, J. Guthrie. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer* **2000**, 88:1224-9
15. M. Königshoff, J. Wilhelm, R.M. Bohle, A. Pingoud,M. Hahn. *HER-2/neu* gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. *Clinical Chemistry, Baltimore*, v.**49**, n.2, p.219-229, 2003.
16. M. Krause, J.D. Leslie, M. Stewart, E.M. Lafuente, F. Valderrama, R. Jagannathan et al. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev. Cell* **7**, p. 571–583, 2004.
17. E.M. Lafuente, A.A.F.L. Van Puijenbroek, M. Krause, C.V. Carman, G.J. Freeman, A. Berezovskaya et al. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and Mediates Rap1-Induced Adhesion. *Dev. Cell*, **Vol. 7**, p. 585–595, 2004.
18. M.B. Lyng, A.K. Lænholm, N. Pallisgaard, H.J. Ditzel. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer*, **8:20**, 2008.

19. D.L. Morse, D. Carroll, L. Weberg, M.C. Borgstrom, J. Ranger-Moore, R.J. Gillies. Determining suitable internal standards for mrna quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **342** p. 69–77, 2005
20. S. Myllykangas, S. Knuutila. Manifestation, Mechanisms And Mysteries Of Gene Amplifications. *Cancer Letters, Amsterdã*, v.**232**, p.79-89, 2006
21. T. Otsuka, T. Kohno, M. Mori, M. Noguchi, S. Hirohashi, J. Yokota. Deletion mapping of chromosome 2 in human lung carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **16**, p. 113–9, 1996
22. S.D. Pack, J.D. Karkera, Z. Zhuang, E.D. Pak, K.V. Balan, P. Hwu, et al. Molecular cytogenetic fingerprinting of esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization reveals a consistent pattern of chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* **25**, p. 160–8, 1999.
23. P. Roy, K. Jacobson. Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **57**, p. 84–95, 2004.
24. M. Schwa. Oncogene amplification in solid tumors. *Cancer Biology*, Vol **9**, p. 319-325, 1999.
25. P. Strickland. Slit2 and netrin1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. *Development* **133**, p. 823–832, 2006.
26. J. Takita, H.W. Yang, Y.Y. Chen, R. Hanada, K. Yamamoto, T. Teitz et al. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene* **20**, p. 4424–32, 2001.
27. U. Vogt, K. Bielawski, C.M. Schlotter, U. Bosse, B. Falkiewicz, A.J. Podhajska. Amplification of *erbB-4* oncogene occurs less frequently than that of *erbB-2* in primary human breast cancer. *Gene* **223**, p. 375–380, 1998
28. W. Wang, S. Goswami, E. Sahai, J.B. Wyckoff, J.E. Segall, J.S. Condeelis. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* **15**, p. 138–145, 2005.
29. R.A. Weinberg. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
30. N. Wittenmayer, B. Jandrig, M. Rothkegel, K. Schluter, W. Arnold, W. Haensch. Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Mol Biol Cell* **15**, p. 1600–1608, 2004.
31. N. Yamamoto, J. Mizoem, H. Numasawam, H. Tsujim, T. Shibaharam, H. Nomam. Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **39**, p. 796–805, 2003.
32. H. Zakut, G. Ehrlich, A. Ayalon, C.A. Prody, G. Malinger, S. Seidman, D. Ginzberg, R. Kehlenbach, H. Soreq. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes

coamplify in primary ovarian carcinomas. *The Journal of Clinical Investigation*, v.86, p.900–908, 1990

APÊNDICE

Dados clínico-histopatológicos das paciente e alteração do gene *RAPH1*

Paciente	Idade	Etnia	Idade Menarca	Idade Menopausa	Uso de Pílula Contraceptiva	Metástase nos linfonodos axilares	(início)		
							Grau do Tumor	Tamanho Tumor	Nº de Filhos
1	77	Euro	-	50	1	2	2	70	3
2	53	-	-	-	-	1	3	21	-
3	68	-	-	-	-	1	2	18	-
4	68	Euro	12	49	-	2	2	-	1
5	55	-	-	-	-	2	-	68	-
6	51	Euro	-	48	-	2	2	55	0
7	-	-	-	-	-	-	2	-	-
8	--	-	-	-	-	-	2	-	-
9	57	Euro	12	53	2	1	3	20	3
10	59	Euro	12	53	2	2	2 e 3	-	2
11	40	-	-	-	-	1	3	32	-
12	-	-	-	-	-	1	2	50	-
13	63	-	13	55	-	1	1	40	4
14	-	-	-	-	-	-	-	25	-
15	44	Euro	15	45	2	-	-	-	2
16	72	Euro	13	52	1	1	1	35	3

17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	56	-	11	52	-	2	2	40	1
19	-	-	-	-	-	-	3	-	-
20	39	-	11	-	1	2	3	40	0
21	65	-	-	-	-	1		25	-
22	31	-	-	-	-	2	3	42	-
23	97	-	-	-	-	-		-	-
24	56	-	-	-	-	2	2	37	-
25	33	-	-	-	-	1	2	40	-
26	44	-	-	-	-	2	2	50	-
27	-	-	-	-	-	-		-	-
28	56	-	-	-	-	1	2	27	-
29	47	-	-	-	-	2	1	25	-
30	62	-	13	Historectomia*	-	1	2	15	2
31	70	-	-	-	-	2	2	80	-
32	45	-	-	Historectomia*	-	2	2	35	3
33	72	-	-	-	-	2	2	35	-
34	67	-	-	-	-	2	2	5	-
35	67	-	-	-	-	2	3	50	-
36	44	-	-	-	-	2	2	18	2
37	48	-	-	-	-	1	2	16	-
38	45	-	-	-	-	1	3	23	-
39	45	-	-	-	-	1	1	5	-

40	62	-	-	-	-	1	1	20	-
41	49	-	13	-	-	1	2	25	-
42	83	-	-	-	-	1	2	8	-
43	33	-	-	-	-	-	-	-	-
44	46	-	-	-	-	1	1	17	
45	49	-	15	-	-	1	2	40	1
46	71	-	-	Histerectomia*	-	1	1	10	9
47	74	-	-	-	-	1	3	35	-
48	81	-	-	-	-	1	2	20	-
49	73	-	-	-	-	1	2	32	-
50	46	-	11	-	-	2	3	40	0
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	78	-	12	Histerectomia*	-	1	2	13	-

Uso de Pílula Contraceptiva: 1- Não 2- Sim

Metástase nos linfonodos axilares: 1- Ausência 2- Presença

*Remoção do útero

(conclusão)

(início)

Paciente	Idade 1ª Gravidez	Fumante	Receptores de Estrogênio	Receptores de Progesterona	Amplificação do gene <i>HER2</i>	Patologia	Alteração gene <i>RAPH1</i>
1	23	2	-	-	-	Carcinoma Intra-ductal Invasor	D
2	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor	A
3	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor	D
4	-	2	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	A
5	-	-	-	-	-	Infiltração Cutânea p/ Ca mamário	A
6	-	1	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	A
7	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor	D
8	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor	D
9	27	1	2	-	2	Doença de Paget associada à Carcinoma Ductal Invasor e Intraductal	A
10	26	1	2	1	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
11	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor	A
12	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Infiltrante	A
13	-	-	-	-	-	Carcinoma Tubular Invasor	D
14	-	-	-	-	-	Carcinoma Medular	D
15	21	-	-	-	-	Carcinoma Ductal	A
16	21	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Multicentrico	A
17	-	-	-	-	-	Neoplasia maligna	D
18	-	-	2	2	2	Carcinoma Ductal Invasor	D
19	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor	D
20	-	-	2	1	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
21	-	-	2	2	1	Carcinoma Papilar Invasor	A
22	-	-	1	2	1	Carcinoma pouco diferenciado, pleomórfico invasor	D

23	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
24	-	-	-	-	-	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Ductal in situ	D
25	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
26	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor Bilateral	A
27	-	-	-	-	-	-	A
28	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Intraductal solido e cibriforme	D
29	-	-	2	2	1	Carcinoma Lobular Invasor	A
30	17	-	1	1	1	Carcinoma Ductal Invasor	A
31	-	-	1	1	1	Carcinoma Lobular Invasor Associado à Carcinoma Lobular in situ	D
32	-	-	2	2	1	Carcinoma Invasor Misto, Ductal e Lobular	A
33	-	-	2	2	2	Carcinoma Ductal Invasor	A
34	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	A
35	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Intraductal	D
36	30	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
37	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
38	-	-	1	1	1	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Ductal in situ	D
39	-	-	2	2	2	Carcinoma Ductal Invasor	D
40	-	-	2	2	2	Carcinoma Ductal Invasor	D
41	30	-	2	2	1	Carcinoma Tubulo Lobular	D
42	-	-	2	1	1	Carcinoma Ductal Invasor Apócrino, Carcinoma "in situ" tipo comedo e cibriforme	D
43	-	-	-	-	-		D
44	-	2	2	2	1	Carcinoma Ductal	D
45	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
46	-	2	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
47	-	-	1	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D

48	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	D
49	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor	A
50	-	-	2	2	1	Carcinoma Ductal Invasor associado a Carcinoma Ductal in situ sólido cibriforme	A
51	-	-	-	-	-	-	D
52	32	-	2	2	1	Carcinoma Misto Ducto Lobular associado a Carcinoma Ductal in situ sólido cibriforme/Carcinoma Lobular invasor mama E	D

Fumante: 1- Não 2- Sim

(conclusão)

Receptores de Estrogênio: 1- Ausente 2- Presente

Receptores de Progesterona: 1- Ausente 2- Presente

Amplificação do gene *HER2*: 1- Não 2- Sim

Alteração do gene *RAPH1*: A- Amplificado D- Deletado