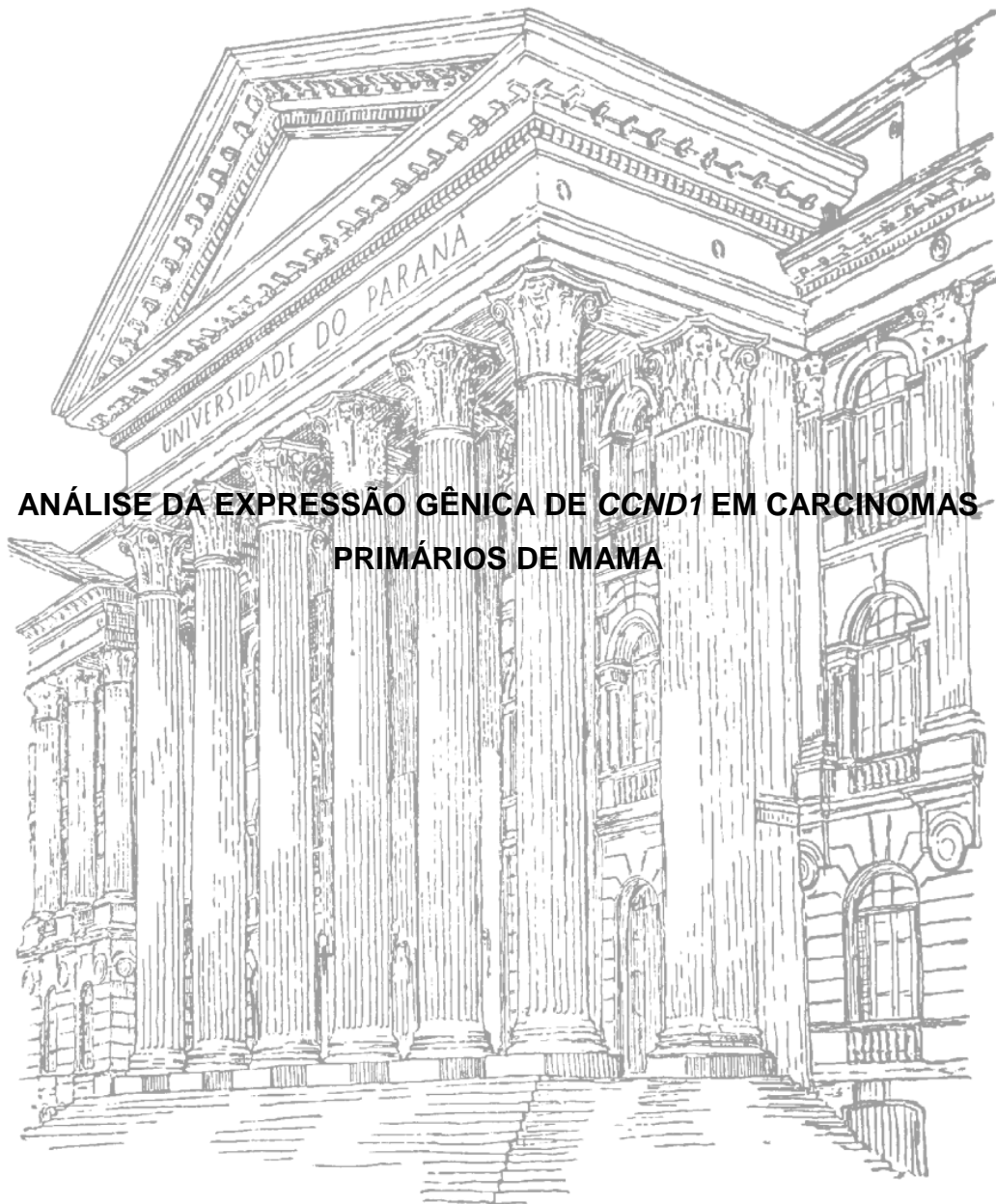


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LORHENN BRYANDA LEMES MAIA**



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CCND1 EM CARCINOMAS  
PRIMÁRIOS DE MAMA**

**CURITIBA  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LORHENN BRYANDA LEMES MAIA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *CCND1* EM CARCINOMAS  
PRIMÁRIOS DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética.

Comissão de orientação:

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza

Profa. Dra. Enilze M. S. F. Ribeiro

Profa. Dra. Valéria Maria Sperandio Roxo

**CURITIBA  
2014**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Maia, Lorchenn Bryanda Lemes

Análise da expressão gênica de CCND1 em carcinomas primários de mama. / Lorchenn Bryanda Lemes Maia. – Curitiba, 2014.

123 f.: il. ; 30cm.

Orientadores: Ricardo Lehtonen Rodrigues. de Souza  
Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca  
Valéria Maria Sperandio Roxo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Cancer 2. Expressão gênica 3. Metastase I. Título II. Souza, Ricardo Lehtonen Rodrigues. de III. Fonseca, Ribeiro, Enilze Maria de Souza IV. Roxo, Valéria Maria Sperandio V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.99449



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LORHENN BRYANDA LEMES MAIA**, 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 à candidata o conceito "A".

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

Curitiba, 24 de março de 2014

**Doutora Giseli Klassen**

Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

**Doutora Angelica Beate Winter Boldt**

Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

**Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**

Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

**Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**  
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

**Profa Dra. Enilze M. S. F. Ribeiro**  
Vice-Coordenadora do PPG-GEN-UFPR  
Matricula 103446

*Aos meus pais, Valdemir Maia e Janete Maia,  
que aprenderam a lidar com a dor da saudade  
para que eu pudesse voar. À eles, que são meu  
maior exemplo de força e amor!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À CAPES (REUNI), muito obrigada pelo suporte financeiro, sem o qual eu não poderia permanecer em Curitiba e desenvolver o curso de mestrado.*

*À Instituição UFPR, muito obrigada por esta oportunidade de um ensino de qualidade.*

*À empresa Life Technologies™, obrigada pela agilidade nos serviços prestados e disponibilidade em assessoria científica.*

*À comissão de orientação, Profa. Dra. Enilze Ribeiro, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen e Profa. Dra. Valéria Roxo, muito obrigada por me estenderem a mão, me dando a oportunidade de lutar por este trabalho. Sou grata pela orientação, às pressas, que me proporcionaram!*

*À banca de examinação composta pelos professores Dr. Ricardo Lehtonen, Dra. Giseli Klassen e Dra. Angelica Beate Winter Boldt, muito obrigada pelas contribuições feitas a este trabalho. Agradeço o tempo e carinho que dedicaram na leitura e correção desta dissertação.*

*À doutoranda Fernanda Breginski, muito obrigada pela parceria nos trabalhos desenvolvidos. Foi um prazer desenvolver as etapas metodológicas do meu mestrado em parceria com você. Formamos uma ótima equipe de trabalho com espaço para uma amizade especial. À você, que além de uma grande parceira nas padronizações experimentais, foi uma amiga.*

*Às queridas, Ana Luiza, Cecília, Pollyana e Tayana, obrigada pela convivência e amizade maravilhosa. Ana sempre me presenteando com aquele abraço e carinho maternal e, Polly, Cécil e Tay com o carinho e alegria que tornaram o meu dia-a-dia no laboratório, mais divertido. À vocês que fizeram do meu ambiente de trabalho um lugar aconchegante e especial.*

*À Curitiba, muito obrigada por me proporcionar a oportunidade de vivenciar este mestrado, me tornar uma mulher mais forte e madura, e ter me dado o meu maridão de presente! À esta cidade fria, que me ensinou que as decepções fazem parte da vida e que é impossível prever o que ainda está por vir!*

*Às minhas grandes amigas e colegas de profissão, Karla Santos e Dellyana Boberg, com as quais aprendi a tirar a máscara vivendo sob o mesmo teto, muito obrigada pelo amor de irmã, amizade, carinho, compreensão, apoio, incentivo e “colinhos”. Em dias difíceis, foram vocês que estiveram ao meu lado. À vocês duas, que foram a minha família em Curitiba.*

*À minha querida amiga Sarah Franco de Oliveira, muito obrigada por ter me direcionado ao mestrado desde a primeira vez que estive em Curitiba, me abrindo as portas desta cidade e me incentivando a nunca desistir. Uma grande amiga que praticamente me pegou pelas mãos e me conduziu a esta*

*Dissertação. À você, minha amiga, que mesmo estando do outro lado do Atlântico me ensinou a viver em Curitiba!*

*Aos meus sogros, Ana e Edmilson, e cunhados, Íris e Everton, muito obrigada pela acolhida aconchegante. O lar de vocês, por muitas vezes, foi o meu oásis. À vocês que hoje também são minha família!*

*À minha grande e preciosa família campograndense, muito obrigada porque são vocês, mesmo distantes, que mantêm minha estrutura em pé com suas orações e amor! À vocês que me amam desde que eu era um bebê de cabelos bem pretinhos!*

*Aos meus amados pais, Janete e Valdemir, que são a essência de quem eu realmente sou. Quanto mais eu vivo, maior é a minha certeza de quão, biologicamente eu sou, metade de cada um de vocês! À vocês, que me deram asas para voar e raízes para voltar! Muito obrigada!*

*Ao meu esposo, André de Souza, que é aquele por quem eu sempre esperei! À você, meu Amor, que é o meu companheiro nas lutas e conquistas do dia-a-dia, tornando as minhas dificuldades mais leves, o meu coração mais calmo e a minha vida completa e feliz. Muito obrigada!*

*À Deus, muito obrigada meu Senhor pelo “agora”. Cada dia é uma nova chance para fazer a diferença e recomeçar. Hoje eu estou aqui, a minha vida é um milagre!*

*Então eu abro o coração.  
Coloco-me aos Seus pés.  
Noite escura, agora é manhã.  
E falo com rara calma:  
Sou o que sou, sei que sou fraca,  
Mas sempre tive Você, aqui, perto de mim.*

*Rosa de Saron*



## RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais incidente entre as mulheres. Mais de 90% das mortes relatadas por câncer de mama, não são causadas pelo tumor primário e sim por suas metástases mamárias. Tais células migratórias são as manifestações mais agressivas do processo do câncer. Embora muitos estudos estejam sendo realizados, não há marcadores moleculares disponíveis para prever o estadiamento dos cânceres de mama. A proteína Ciclina D1 têm sido amplamente estudada ao longo das últimas décadas, por seus diversos papéis nos processos fisiológicos de células normais e cancerosas. Suas funções, que incluem o controle do ciclo celular e a coregulação da transcrição gênica de sequências específicas, tem se mostrado associadas à tumorigênese. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a importância do gene *CCND1* como potencial marcador de progressão tumoral em carcinomas mamários. Foram utilizadas 41 amostras parafinizadas de carcinomas mamários do subtipo ductal invasor. Estas amostras foram subdivididas em tumores metastáticos e não-metastáticos de acordo com a informação sobre a presença de metástases em linfonodos axilares regionais. Foram realizadas análises de expressão gênica (mRNA), através da PCR quantitativa em tempo real, e proteica, por imunohistoquímica. Não foram identificadas diferenças nos níveis de mRNA de *CCND1* e da proteína Ciclina D1 entre os tumores mamários metastáticos e não-metastáticos, sugerindo que, nesta amostra, a expressão gênica de *CCND1*, ao nível de mRNA e proteína, não influenciou significativamente no processo metastático. Na literatura, a Ciclina D1 apresenta valor diagnóstico e prognóstico bem definido em linfomas, onde é um critério diagnóstico no Linfoma de Células do Manto. Para a maioria dos cânceres sólidos, porém, ainda é controverso, com alguns autores diferenciando o significado biológico da amplificação gênica e da superexpressão da proteína, desde que estas não são interdependentes. Devido a estas controvérsias, mais estudos devem ser realizados, na tentativa de esclarecer o valor diagnóstico e prognóstico da Ciclina D1, bem como os vários mecanismos que desencadeiam sua superexpressão em tumores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de mama. Expressão gênica. *CCND1*. Metástases. Progressão tumoral.

## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common cancer worldwide and the most frequent among women. Over 90% of reported deaths from breast cancer are not caused by the primary tumor, but by their mammary metastases. These migratory cells are the most aggressive manifestations of the cancer process. Although many studies are being conducted, there are no molecular markers available to predict the staging of breast cancers. The Cyclin D1 protein has been extensively studied over the past decades by its many roles in the physiological processes of normal and cancer cells. Its functions, ranging from cell cycle control to the specific sequences of gene transcription co-regulation, have been associated with tumorigenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the importance of *CCND1* gene as a potential marker of tumor progression in breast carcinomas. Forty-one paraffin embedded samples of invasive ductal breast carcinomas subtype were used. These samples were subdivided into metastatic and non-metastatic tumors according to the information about the presence of regional metastases in the axillary lymph nodes. Gene expression analyses (mRNA) were performed by quantitative real-time PCR, and protein expression by immunohistochemistry. No differences were observed in mRNA levels of *CCND1* and Cyclin D1 protein between metastatic and non-metastatic breast tumors, suggesting that, in this sample, the gene expression of *CCND1* no significantly influenced the metastatic process. In literature, the diagnostic and prognostic value of Cyclin D1 is well defined in lymphomas, which is a diagnostic criterion in Mantle Cell Lymphoma. For most cancers, however, it is still controversial, with some authors distinguishing between the biological significance of gene amplification and protein overexpression, since these are not interdependent. Because of these controversies, further studies should be conducted in an attempt to clarify the value of Cyclin D1 as a marker in breast cancer, as well as the various mechanisms which trigger its overexpression in tumors.

**KEYWORDS:** Breast cancer. Gene expression. *CCND1*. Metastases. Tumor progression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b>	Modelo de progressão tumoral linear .....	18
<b>FIGURA 2.</b>	Relação dos 10 tipos de câncer mais incidentes .....	20
<b>FIGURA 3.</b>	“Campo de cancerização” .....	28
<b>FIGURA 4.</b>	“Propriedades” do câncer.....	29
<b>FIGURA 5.</b>	Cascata de invasão-metástase .....	33
<b>FIGURA 6.</b>	Estrutura da Ciclina D1 (D1a) e Ciclina D1b.....	38
<b>FIGURA 7.</b>	Holoenzimas responsáveis pela progressão do ciclo celular .....	40
<b>FIGURA 8.</b>	Controle do nível da Ciclina D1 .....	42
<b>FIGURA 9.</b>	Controle da transição pelo ponto R .....	43
<b>FIGURA 10.</b>	Funções, dependentes de CDK, da Ciclina D1.....	48
<b>FIGURA 11.</b>	Funções, independentes de CDK, da Ciclina D1.....	49
<b>FIGURA 12.</b>	Regulação da degradação da Ciclina D1 em célula normal <i>versus</i> célula de câncer .....	52
<b>FIGURA 13.</b>	Esquema de funcionamento da sonda <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Relação das amostras de tumor primário com positividade de metástases em linfonodos axilares (LNP) e suas respectivas características clínico-patológicas.....	103
<b>TABELA 2.</b> Relação das amostras de tumor primário com negatividade de metástases em linfonodos axilares (LNN) e suas respectivas características clínico-patológicas.....	104
<b>TABELA 3.</b> IDs dos ensaios <i>TaqMan®Gene Expression Assays -Assay on-demand</i> .....	109

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1.</b> Reagentes utilizados nas reações dos ensaios de expressão gênica (mRNA).....	108
<b>QUADRO 2.</b> Programa de ciclagem das reações dos ensaios de expressão gênica (mRNA) .....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTB</b>	- Gene da $\beta$ -actina.
<b>AINE</b>	- Antiinflamatório não-esteróide.
<b>AP-1</b>	- Jun proto-oncogene ( <i>JUN</i> ).
<b>AR</b>	- Receptor de andrógeno.
<b>B2M</b>	- Gene da $\beta$ -2-microglobulina.
<b>BRCA1</b>	- Gene câncer de mama 1.
<b>BRCA2</b>	- Gene câncer de mama 2.
<b>CCND1</b>	- Gene da Ciclina D1 ( <i>BCL1</i> , <i>PRAD1</i> ).
<b>cDNA</b>	- DNA complementar (DNA fita simples resultante da retrotranscrição).
<b>CDI</b>	- Carcinoma mamário ductal invasor.
<b>CDK</b>	- Cinase dependente de ciclina.
<b>CGH</b>	- Hibridização genômica comparativa.
<b>CK5/6</b>	- Citoqueratinas 5 e 6.
<b>CSCs</b>	- Células-tronco do câncer.
<b>CT</b>	- Células-tronco.
<b>Ct</b>	- <i>Cycle threshold</i> .
<b>CTCs</b>	- Células do tumor circulantes.
<b>C+</b>	- Controle positivo da reação.
<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	- CCAAT/proteína vinculativa potenciadora (C/EBPB), beta.
<b>DAB</b>	- Cromógeno diaminobenzidina.
<b>DSB</b>	- Quebra de dupla-fita do DNA.
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribunucleico.
<b>dNTP</b>	- Desoxirribunucleotídeos.
<b>DTCs</b>	- Células do tumor disseminadas.
<b>D1a</b>	- Transcrito para a Ciclina D1.
<b>D1b</b>	- Transcrito para isoforma resultante do processamento alternativo de Ciclina D1.
<b>EGFR</b>	- Receptor do fator de crescimento epidermal.
<b>ER</b>	- Receptor de estrógeno.
<b>ERK</b>	- Cinase regulada por sinal extracelular.
<b>EMS1</b>	- Cortactina ( <i>CTTN</i> )

<b>EMT</b>	- Transição epitelial-mesenquimal.
<b>E2F</b>	- Família de fatores transcricionais.
<b>FC</b>	- <i>Fold Change</i> .
<b>gDNA</b>	- DNA genômico.
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	- Cinase glicogênio sintetase-3 $\beta$ .
<b>G<sub>0</sub></b>	- Fase de quiescência (ciclo celular).
<b>G<sub>1</sub></b>	- Fase de <i>gap</i> 1 (ciclo celular).
<b>HDACs</b>	- Histonas desacetilases.
<b>HATs</b>	- Histonas acetiltransferases.
<b>HER2</b>	- Oncogene fator de crescimento epidermal 2 ( <i>ERBB2</i> ).
<b>IHQ</b>	- Imunohistoquímica.
<b>INCA</b>	- Instituto Nacional do Câncer.
<b>Kb</b>	- Kilobase
<b>Ki-67</b>	- Marcador de proliferação (MKT67).
<b>LNP</b>	- Tumor primário com positividade de metástases em linfonodo axilar.
<b>LNN</b>	- Tumor primário com negatividade de metástases em linfonodo axilar.
<b>LOH</b>	- Perda de heterozigose.
<b>MCL</b>	- Linfoma de células do manto.
<b>MEK</b>	- MAPK cinase.
<b>MET</b>	- Transição mesenquimal-epitelial (processo inverso ao EMT).
<b>miRNAs</b>	- MicroRNAs.
<b>mRNA</b>	- RNA mensageiro.
<b>MGB</b>	- <i>Minor groove binder</i> .
<b>mTOR</b>	- Alvo mecânico de rampamicina (serina/threonina cinase).
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	- Fator nuclear potenciador de gene polipeptídeo <i>kappa light</i> em células B-1 (NFKB1).
<b>NFR-1</b>	- Fator nuclear respiratório (NRF1).
<b>NTC</b>	- <i>No template control</i> (controle negativo da reação).
<b>NTCL</b>	- Amostra de tecido não-tumoral da mama contralateral sadia.
<b>PAHs</b>	- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	- Receptor peroxissomo proliferador ativado.
<b>PCR</b>	- Reação em cadeia da polimerase.

<b>Pi3K</b>	- Cinase-3-fosfatidilinositol.
<b>pb</b>	- Par de bases.
<b>PPIA</b>	- Gene do peptidilprolil isomerase A (ciclofilina A).
<b>PR</b>	- Receptor de progesterona.
<b>pRB</b>	- Proteína do retinoblastoma.
<b>p21<sup>Cip1</sup></b>	- Proteína p21 inibidora de CDKs.
<b>p27<sup>Kip1</sup></b>	- Proteína p27 inibidora de CDKs.
<b>P/CAF</b>	- K (lisina) acetiltransferase 2B (KAT2B)
<b>QNF</b>	- <i>Quencher</i> não-fluorescente.
<b>RAD51</b>	- Recombinase RAD51.
<b>RH</b>	- Recombinação homóloga.
<b>RNA</b>	- Ácido ribonucleico.
<b>ROCK2</b>	- Proteína bobina-enrolada associada a Rho 2.
<b>RQ</b>	- Quantificação relativa.
<b>RT-PCR</b>	- Reação em cadeia da polimerase que se segue à retrotranscrição.
<b>qPCR</b>	- PCR quantitativa em tempo real.
<b>RT-</b>	- Reação de retrotranscrição negativa.
<b>S</b>	- Fase da intérfase (ciclo celular).
<b>SD</b>	- Desvio padrão.
<b>SNP</b>	- polimorfismo de nucleotídeo único
<b>S6K</b>	- S6 cinase-1.
<b>TF</b>	- Fator de transcrição.
<b>T<sub>m</sub></b>	- Temperatura de dissociação ( <i>melting</i> ).
<b>TP53</b>	- Gene da proteína p53.
<b>T286</b>	- Resíduo de treonina na posição 286 (regula a degradação da Ciclina D1).
<b>μL</b>	- Microlitros (unidade de volume).
<b>μm</b>	- Micrômetro (unidade de distância).
<b>ng</b>	- Nanogramas (unidade de massa).
<b>ng/μL</b>	- Nanogramas por microlitro (unidade de concentração).
<b>3' UTR</b>	- Região 3' não traduzida do mRNA.
<b>ΔCt</b>	- Variação do gene alvo normalizado pelos controles endógenos ( <i>Ct gene alvo – Ct controle endógeno</i> ).



- $\Delta\Delta C_t$**  - Variação do gene alvo em relação à um calibrador ( $\Delta C_{tTUMOR} - \Delta C_{tCALIBRADOR}$ ).
- $\Delta R_n$**  - Intensidade de fluorescência normalizada pela referência passiva.
- $\chi^2$**  - Teste estatístico de qui-quadrado.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Epidemiologia e etiologia do câncer de mama .....	19
2.2 Principais genes relacionados ao câncer de mama .....	21
2.3 Classificação do câncer de mama.....	22
2.3.1 Classificação histológica .....	23
2.3.2 Classificação molecular.....	24
2.4 Progressão tumoral .....	26
2.4.1 Metastatização .....	30
2.5 Ciclina D1 .....	36
2.5.1 Estrutura gênica ( <i>CCND1</i> ) .....	37
2.5.2 Ciclina D1 e o controle do ciclo celular.....	39
2.5.3 Outras funções da Ciclina D1.....	44
2.5.4 Ciclina D1 como um oncogene.....	49
2.5.5 Papel da Ciclina D1 no câncer de mama .....	54
2.6 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) .....	56
2.6.1 Sistema de detecção: Sonda fluorescente <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> .....	59
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	63
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	64
4.1 Geral.....	64
4.2 Específicos .....	64
<b>5. CAPÍTULO I</b> .....	65
ARTIGO.....	65
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS</b> .....	100
<b>APÊNDICES</b> .....	101

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2012), o câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais incidente entre as mulheres. Sendo assim, é um dos principais problemas de saúde pública no mundo Ocidental, especialmente nos países em desenvolvimento.

Inicialmente, o câncer de mama foi considerado como uma doença única apresentando diferentes características histopatológicas e variável resposta ao tratamento sistêmico. De acordo com Reis-Filho e Pusztai (2011), devido ao advento das novas tecnologias, baseadas na análise da expressão gênica, o câncer de mama não é mais interpretado de uma forma simplista como uma doença única apresentando variações clínicas e patológicas. Atualmente, é definido como um conjunto de diferentes doenças que afetam o mesmo órgão, tendo origem a partir da mesma estrutura, mas com diferentes características histopatológicas, fatores de risco e respostas às terapias sistêmicas. Estas diferentes respostas às terapias, são devidas as características moleculares dos tumores, que hoje, podem ser diagnosticadas através de métodos moleculares.

Embora seja observado um aumento nas taxas de sobrevivência, devido aos vários avanços no diagnóstico e tratamento, 20 a 30% das pacientes com diagnóstico de tumor primário de mama apresentarão recorrência da doença em sítios distantes, evidenciando a presença de micrometástases (VELASCO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2012). A progressão tumoral, com a invasão adjacente e posteriormente o desenvolvimento de metástases mamárias, é a principal responsável pela alta taxa de mortalidade observada nas pacientes (GUNASINGHE *et al.*, 2012), evidenciando a necessidade de marcadores moleculares capazes de predizer precocemente o estadiamento do câncer, ao longo de sua progressão.

Bertucci, Birnbaum e Gonçalves (2006), enfatizam a importância que os estudos moleculares têm tido na elucidação de alguns mecanismos da oncogênese mamária e na identificação de importantes genes que permitiram consideráveis avanços terapêuticos. Com o advento de novas tecnologias, as aplicações das técnicas moleculares tornaram-se mais eficientes, fornecendo novas possibilidades de elucidar aspectos, até então desconhecidos, do câncer. Através da análise por *microarrays* originou-se uma nova classificação

dos cânceres de mama estabelecendo subtipos moleculares intrínsecos, baseados nos perfis de expressão gênica (PEROU *et al.*, 2000).

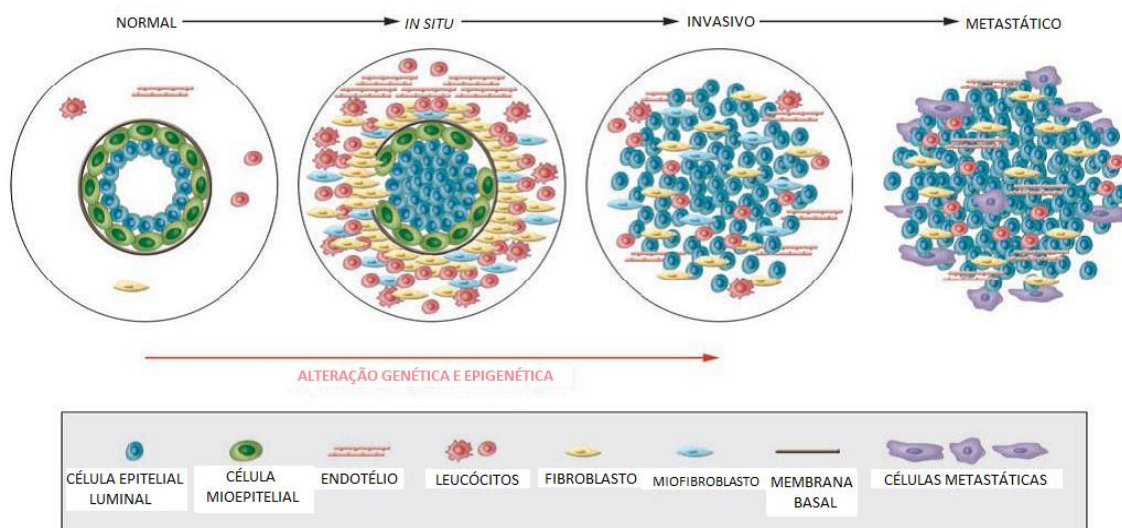
Esta linha de pesquisa vem se mostrando bastante promissora, especialmente em doenças altamente heterogêneas como o câncer de mama. Embora muitos estudos estejam sendo realizados, não há marcadores moleculares disponíveis para predizer com eficácia o estadiamento destes cânceres. Assim, é de importância que se intensifiquem estudos com o objetivo de identificar eficazes marcadores de progressão tumoral. Atualmente, o prognóstico da doença tem sido baseado em parâmetros histológicos e clínicos (tipo/tamanho do tumor, presença/ausência de metástases em linfonodos axilares, presença/ausência dos receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR) e do fator de crescimento epidermal 2 (*HER2* ou *ERBB2*), e embora estes fatores sejam de importância prognóstica, a sua capacidade informativa é limitada.

A proteína Ciclina D1 têm sido amplamente estudada ao longo das últimas décadas pelos seus diversos papéis nos processos fisiológicos de células normais e cancerosas. Alterações genômicas como as amplificações gênicas e funcionais decorrentes da superexpressão de Ciclina D1, têm sido frequentemente observadas em diversos tumores, sugerindo relevância deste gene para a tumorigênese. Evidências sugerem que, além de sua função amplamente conhecida no controle do ciclo celular, outras funções, cinase independente, têm sido desempenhadas pela Ciclina D1. Entre elas, a regulação do metabolismo para formação de células de gordura (WANG *et al.*, 2003a; LAMB *et al.*, 2003), e a co-regulação transcricional de sequências específicas, decorrente de sua associação física a fatores transcricionais, incluindo ER (LAMB *et al.*, 2000) e receptor androgênico (AR) (KNUDSEN, CAVENEE & ARDEN, 1999); dependendo em parte de sua associação a histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) para o remodelamento da cromatina. Emergentes evidências demonstram que o papel da Ciclina D1 na co-regulação transcricional pode influenciar fortemente suas funções no câncer.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a teoria monoclonal do câncer, os tumores originam-se a partir de uma única célula ocorrendo a progressão tumoral pelo acúmulo de mutações adquiridas, resultando numa seleção sequencial de sublinhagens celulares (NOWEL, 1976), que, ao longo das gerações, adquirem um potencial proliferativo ilimitado, capacidade invasiva e metastatização; características fundamentais nos processos de iniciação e progressão tumoral.

O modelo de progressão tumoral linear sugere que o câncer de mama é iniciado com uma hiperplasia epitelial atípica, que em sequência torna-se um carcinoma *in situ*, progredindo para um carcinoma invasivo, resultando num câncer de mama metastático (Figura 1; POLYAK, 2007). No entanto, de acordo com Balmain, Gray e Ponder (2003), nem todos os tumores seguem esta ordem de progressão e podem até mesmo não apresentar todos estes estágios.



**FIGURA 1. Modelo de progressão tumoral linear.** Este modelo esquematiza a progressão da estrutura ducto-mamária normal para um carcinoma *in situ*, passando por invasivo e culminando num carcinoma metastático. Os ductos mamários são formados pela membrana basal e uma bicamada de células luminais (camada mais interna) e mioepiteliais (camada mais externa). No carcinoma *in situ* as células mioepiteliais estão em menor número, devido à degradação da membrana basal, e o número de células luminais é maior. A perda de células mioepiteliais e da membrana basal resulta no carcinoma invasivo, nos quais as células tumorais invadem os tecidos adjacentes e podem migrar para órgãos distantes, determinando à formação de metástases.

**FONTE:** Polyak, 2007 (modificado).

O câncer é uma doença genética, que se desenvolve através de alterações envolvendo principalmente a ativação de proto-oncogenes (FEARON & VOGELSTEIN, 1990), inativação de genes supressores de tumor

(WEINBERG, 1991), alterações nos genes de reparo do DNA (HOEIJMAKERS, 2001), instabilidades cromossômicas (LENGAUER, KINZLER & VOGELSTEIN, 1998) e reativação da telomerase (AUTEXIER & GREIDER, 1996). No entanto, de acordo com Polyak (2007), além dessas alterações genéticas, as alterações epigenéticas e do microambiente também exercem grande importância na tumorigênese. MicroRNAs também contribuem significativamente para o desenvolvimento desta patologia, uma vez que estão associados aos processos de proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento e apoptose, além de estarem envolvidos na cascata de invasão-metástase regulando genes associados a este evento de forma direta ou indiretamente, influenciando os mecanismos epigenéticos (van SCHOONEVELD *et al.*, 2012).

## **2.1 Epidemiologia e etiologia do câncer de mama**

O câncer de mama tem sido considerado um dos principais problemas de saúde no mundo Ocidental, onde estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (INCA, 2012). A letalidade desta doença está relacionada ao diagnóstico tardio, principalmente em países de baixa e média renda, com baixo padrão educacional e dificuldades de acesso aos serviços de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Mesmo com os importantes avanços para sua detecção, diagnóstico e tratamento em estágios iniciais, nas últimas décadas, o câncer de mama ainda é considerado uma das principais doenças potencialmente letais em mulheres (ABDUL-RASOOL *et al.*, 2006). É o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, e o mais comum entre as mulheres, com 22% de novos casos a cada ano (OLDENBURG *et al.*, 2007).

De acordo com o INCA (2012), 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 tardiamente, em estágios avançados da progressão. Dados recentes indicam que no Brasil, 57.120 novos casos de câncer de mama são estimados para 2014 em todo o país (Figura 2), com um risco estimado de 57 casos a cada 100 mil mulheres,

sendo que 3.490 novos casos são para o estado do Paraná e 910 para Curitiba (INCA, 2014).

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

**FIGURA 2. Relação dos 10 tipos de câncer mais incidentes.** Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

**FONTE:** INCA, 2014.

As causas do câncer de mama ainda não são totalmente conhecidas. Estudos epidemiológicos indicam alguns fatores de risco endógenos e exógenos que podem conferir suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer de mama. Segundo Oldenburg *et al.* (2007), a extensão e duração da exposição a hormônios sexuais têm sido identificados como fator de risco em muitos estudos epidemiológicos. Isto inclui hormônios sexuais endógenos, relacionados ao ciclo menstrual, bem como hormônios exógenos derivados de contraceptivos e terapia de reposição hormonal (DUMITRESCU & COTARLA, 2005). Fatores reprodutivos, tais como: menarca precoce - antes dos 11 anos de idade, menopausa tardia - depois dos 50 anos de idade, nuliparidade e idade da primeira gestação acima dos 30 anos, também apresentam risco elevado, devido à exposição às altas taxas de estrogênio endógeno. Outros fatores, no entanto, também devem ser considerados: exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade, exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), tabagismo, alcoolismo, obesidade ou alta densidade óssea após a menopausa, doença proliferativa benigna da mama e história familiar de câncer (ZHENG *et al.*, 1999; GERGER *et al.*, 2007).

Com relação à vida reprodutiva da mulher, cabe ressaltar que o número de ciclos ovarianos está diretamente associado ao risco de desenvolver câncer de mama, diminuindo cerca de 15% a cada ano de retardo do início da menarca, bem como aumentando aproximadamente 3% a cada ano de retardo da menopausa (INCA, 2012).

Contrapondo estes fatores de risco, de acordo com Oldenburg *et al.*, (2007), na região da Ásia e África, a boa qualidade de vida pelo consumo de frutas e vegetais além da prática de atividade física, aspectos reprodutivos como menopausa e gravidez completa em idade precoce, alta paridade, amamentação e, o uso de drogas anti-inflamatórias não-esteróide (AINEs), representam fatores que diminuem a suscetibilidade ao câncer de mama.

Devido à alta heterogeneidade clínica-histopatológica é difícil determinar os mecanismos envolvidos nos processos de desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Segundo Polyak (2001; 2007), o significado patogenético e a relação das alterações moleculares do câncer, descritas na literatura, em seus diferentes estágios de progressão tumoral, ainda não são bem compreendidos.

## **2.2 Principais genes relacionados ao câncer de mama**

A etiologia do câncer de mama possui caráter multifatorial, e segundo Storchova e Pellman (2004), é caracterizada por diversas alterações gênicas e genômicas, como mutações de ponto, rearranjos, deleções e amplificações, resultando na modificação da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor.

Diferentes tipos de mutações estão envolvidos na carcinogênese mamária. Os principais tipos de mutações, além das translocações cromossômicas, são de ganho de função, onde a proteína mutante adquire novas características, como na ativação dos oncogenes, ou perda de função, onde a proteína não é sintetizada, ou é sintetizada em uma taxa pequena, insuficiente para desempenhar sua função biológica, como ocorre com os genes supressores de tumor (NUSSBAUM, McINNES & WILLARD, 2001). Os proto-oncogenes associam-se positivamente a um crescimento celular, em resposta a estímulos fisiológicos. Quando mutados tornam-se oncogenes, resultando em formas proteicas permanentemente ativas, de modo que a proliferação celular é contínua e independente de estímulos externos (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Segundo Oldenburg e colaboradores (2007), os genes supressores de tumor estão associados ao controle negativo do crescimento celular, e agrupados em duas categorias: *gatekeepers* e *caretakers*. Os genes da categoria *gatekeepers* regulam negativamente a proliferação celular ou positivamente a apoptose, protegendo a célula de um



crescimento desordenado, enquanto os *caretakers* suprimem indiretamente o crescimento neoplásico, codificando proteínas que atuam na manutenção da integridade genômica, reparando os danos acometidos ao DNA.

O câncer de mama pode ser hereditário ou esporádico. O primeiro ocorre em 5-10% dos casos (GALVÃO *et al.*, 2011). Assim, a história familiar constitui um importante fator de risco, especialmente quando são observados casos de câncer de mama bilateral e em homens (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). A história familiar de câncer de mama está associada a um aumento de cerca de duas a três vezes no risco de desenvolver essa neoplasia. Alterações em alguns genes responsáveis pela regulação e pelo metabolismo hormonal e reparo do DNA aumentam o risco de desenvolver câncer da mama (INCA, 2012). Segundo Nusbaum e Isaacs (2007), em muitas famílias a predisposição ao câncer de mama pode ser atribuída a mutações em dois principais genes relacionados ao câncer de mama, o *BRCA1* e o *BRCA2*. Estes genes atuam na manutenção da integridade genômica, e portanto são considerados genes supressores de tumor (OLDENBURG *et al.*, 2007), desempenhando um papel na carcinogênese. Entre as funções desempenhadas por *BRCA 1*, inclui-se o reparo do DNA, ubiquitinação de proteínas, remodelamento da cromatina e controle do *checkpoint* do ciclo celular. *BRCA2* está envolvido no reparo de quebras dupla-fita do DNA (DSB) através da recombinação homóloga (RH) (OLDENBURG *et al.*, 2007). O gene *BRCA1* está localizado no cromossomo 17, tem 22 exons e codifica uma proteína com 1863 aminoácidos. O *BRCA2* localiza-se no cromossomo 13, é formado por 27 exons e codifica uma proteína com 3418 aminoácidos (OLDENBURG *et al.*, 2007). Além destes, outros genes foram identificados como componentes de alta susceptibilidade ao câncer de mama, entre eles, *PTEN* e *TP53* (BRADBURY & OLOPADE, 2007). Na forma esporádica, que ocorre em 90-95% dos casos (GALVÃO *et al.*, 2011), a doença é resultante de mutação somática em genes importantes como os supressores de tumor, entre eles o *TP53*, e em proto-oncogenes, como o *HER2*.

### **2.3. Classificação do câncer de mama**

Sendo uma doença heterogênea, o câncer de mama compreende várias entidades associadas com aspectos morfológicos, imunohistoquímicos, clínicos e genéticos específicos. Até recentemente, a sua classificação incluía subtipos

baseados na presença de receptores hormonais estrogênio (ER) e progesterona (PR) e na amplificação do oncogene *HER2* (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001), associados a sua agressividade e resposta terapêutica. Esta classificação mostrou-se útil para o prognóstico e no direcionamento do tratamento adjuvante com o antiestrógeno Tamoxifeno para pacientes ER ou PR positivas, ou com o anticorpo monoclonal humanizado Trastuzumabe para pacientes com amplificação ou superexpressão do oncogene *HER2*.

### **2.3.1. Classificação histológica**

Parâmetros como tamanho do tumor, grau histológico, presença/ausência de linfonodos metastáticos, ER e PR, são usados na classificação histológica dos tumores mamários, sendo que o grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando maior ou menor capacidade de metastatização. De acordo com Scarff e Torloni (1968), o grau de diferenciação histológica do tumor está baseado na análise de três parâmetros: a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica.

A classificação histoprognóstica considera tumores de grau I, os bem diferenciados que apresentam prognóstico favorável; os de grau II, moderadamente diferenciados que apresentam prognóstico intermediário e; os de grau III, que são pouco diferenciados, apresentando pior prognóstico (BOMBARDIERI, GIANNI & BONADONNA, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) os carcinomas mamários são histologicamente classificados quanto a sua localização e extensão, em carcinomas *in situ* e invasivo, e conforme sua origem, em ductais (desenvolvimento nos ductos mamários) representando cerca de 80% dos tumores e, lobulares (desenvolvimento no interior dos lóbulos) representando entre 10% a 15% dos casos (VARGO-GOGOLA & ROSEN, 2007).

Bombardieri, Gianni e Bonadonna (2008), utilizaram parâmetros como tamanho do tumor; número, localização e método de detecção de metástases em linfonodos regionais, para classificá-los no sistema de classificação de tumores malignos (TNM), onde T, é a extensão do tumor primário, N, se a metástase está ou não presente nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática e M, a presença ou ausência de metástases a distância.

### 2.3.2. Classificação molecular

A classificação molecular, introduzida com os estudos de expressão gênica (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; 2003), tem demonstrado que a heterogeneidade morfológica do câncer de mama pode ser sistematicamente classificada em nível transcricional, pelo perfil de expressão dos genes. De acordo com Parker e colaboradores (2009), os perfis de expressão gênica permitiram aprofundar o conhecimento da complexidade dos tumores de mama, podendo, inclusive, fornecer informações quanto ao prognóstico das pacientes.

Estudos iniciais (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; 2003) apresentaram uma classificação com base nos perfis de expressão gênica obtidos por *microarrays*, estabelecendo cinco subtipos moleculares de cânceres de mama que diferem quanto a origem, uma vez que tumores basais compartilham algumas características moleculares com as células mioepiteliais, enquanto os tumores luminais compartilham características moleculares com as células luminais (PEROU *et al.*, 2000), e pelo perfil de expressão, associados a prognósticos e respostas clínicas diferentes (BERTUCCI *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2008). Os cinco subgrupos classificados foram: dois grupos, **a)** Luminal A e **b)** Luminal B, ER e PR positivos, que exibem padrão de expressão similar ao das células epiteliais presentes na camada interna do ducto mamário (células luminais); **c)** um grupo com amplificação do oncogene *HER2* e expressão aumentada da proteína codificada; **d)** um grupo *normal breast-like* com expressão semelhante a das células normais com alta expressão de genes da camada basal e baixa expressão de genes da camada luminal e **e)** um grupo *basal-like* previamente reconhecido como um subgrupo semelhante ao basal. Segundo Loi (2008), o subgrupo luminal A tem maior expressão de ER e genes regulados pelo estrogênio e um melhor desenvolvimento clínico quando comparado ao luminal B, que tem maior atividade proliferativa, pior prognóstico e está presente em 60% dos tumores. Além disso, embora ambos os subtipos luminais, A e B, sejam ER e PR positivos, o luminal A é receptor de fator de crescimento epidermal 2 (*HER2*) negativo, enquanto o luminal B é positivo (GONÇALVES *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi identificado o grupo de tumores *claudin-low* (PRAT *et al.*, 2010), baseado no fato que estes tumores apresentam baixa expressão dos

genes claudinas, incluindo as claudinas 3, 4 e 7. Este grupo é considerado um subtipo dos tumores triplo-negativos. As proteínas claudinas estão envolvidas nas junções comunicantes entre duas células, juntamente com as E-caderinas (PEROU, 2011). De acordo com Valentin *et al.*, (2012), neste subgrupo de tumores há um aumento da expressão de genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (EMT), tendo como característica a perda das proteínas de junção, o que resulta em padrões comportamentais de células-tronco favorecendo o mecanismo de EMT (PEROU, 2011). O subgrupo apócrino molecular também foi adicionado recentemente, sendo caracterizado pelo aumento da expressão do receptor de andrógeno (AR). Estes tumores são ER e PR negativos e AR positivos, embora quase todos os tumores ER positivos expressem também AR (VALENTIN *et al.*, 2012). Estes subtipos, identificados através dos perfis de expressão gênica, são reconhecidos como os subtipos intrínsecos do câncer de mama.

Goldhirsch e colaboradores (2011) descreveram uma classificação alternativa baseada em marcadores que são frequentemente utilizados pela patologia no diagnóstico imunohistoquímico, como ER, PR, *HER2* e Ki67.

De acordo com Cleator, Heller e Coombes (2007), tumores que não expressam os receptores ER, PR e *HER2* são referidos “triplo-negativos” e caracterizados por um comportamento clínico agressivo, rápida progressão tumoral e baixa sobrevida (REIS-FILHO & TUTT, 2008), sendo responsáveis por 15% a 20% de todos os carcinomas mamários (BAUER *et al.*, 2007). Apesar do perfil de expressão gênica dos tumores triplo-negativos ser igual ao do subtipo *basal-like* quanto a negatividade do ER, PR e *HER2*, Cheang e colaboradores (2008), ao evidenciarem cinco biomarcadores (ER, PR, *HER2*, EGFR, e CK5/6) para definir o subtipo *basal-like*, sugerem que este é mais heterogêneo e possui maior valor prognóstico que o fenótipo triplo-negativo, não havendo uma superposição completa entre estes grupos. A grande dificuldade no manejo clínico das pacientes com tumores triplo-negativos consiste no fato delas não responderem às terapias-alvo disponíveis.

Entre uma série de marcadores moleculares com potencial prognóstico e terapêutico identificados para o câncer de mama, os ER e PR e o oncogene *HER2* são os mais utilizados na prática clínica. Pusztai e colaboradores (2003), ao descreverem diferenças na expressão de genes entre tumores ER+ e ER-

sugerem a existência de outros subgrupos moleculares em adição ou dentro das categorias já propostas. Neste mesmo sentido, estudos atuais reforçam as diferenças entre os tumores ER+ e ER- (JONES, CONSTANTINIDOU & REIS-FILHO, 2012), enfatizando a importância de mais estudos que objetivem identificar novos e eficazes marcadores moleculares que complementem os marcadores já descritos e que sejam capazes de direcionar mais especificamente o tratamento, com base numa classificação mais detalhada.

#### **2.4 Progressão tumoral**

Smalley e Ashworth (2003) descrevem a importância que células-tronco (CT), presentes no tecido mamário, têm, tanto para o desenvolvimento e manutenção das glândulas mamárias adultas, quanto para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Devido ao seu grande potencial replicativo e longo tempo de vida, o que lhes permitem acumular várias mutações ao longo do tempo, as CTs têm se tornado excelentes candidatas como células de origem do câncer. Embora ainda haja um debate em curso quanto à existência de células-tronco epiteliais na glândula mamária adulta, algumas evidências experimentais apoiam a hipótese de que as CTs normais presentes na glândula mamária adulta são, de fato, a principal meta na tumorigênese, formando população de células-tronco de tumor (SMALLEY & ASHWORTH, 2003).

A glândula mamária adulta requer CTs (ou uma atividade característica delas), para atender as demandas de expansão epitelial ocorrentes no período da gestação e para substituir as células que são perdidas através da renovação celular de rotina. Em um modelo *in situ* da proliferação epitelial da mama humana, células que foram positivas para o ER, se mostraram negativas para o marcador de proliferação Ki67, apresentando altos níveis do inibidor de CDKs, p27<sup>Kip1</sup> (CLARKE *et al.*, 1997; 2000). Estas evidências, levaram os pesquisadores a sugerir que estas células podem ser as CTs mamárias, com taxas de proliferação muito lentas. Em contraste, o número de células que são ER positivos, são também Ki67 positivos e aumentam em tumores (SHOKER *et al.*, 1999), indicando que estas células escapam do controle de crescimento.

A existência de um potencial para célula-tronco de câncer (CSCs), é um conceito antigo (REYA *et al.*, 2001). No entanto, durante a última década, a noção de que os tumores são mantidos por suas próprias células-tronco, as

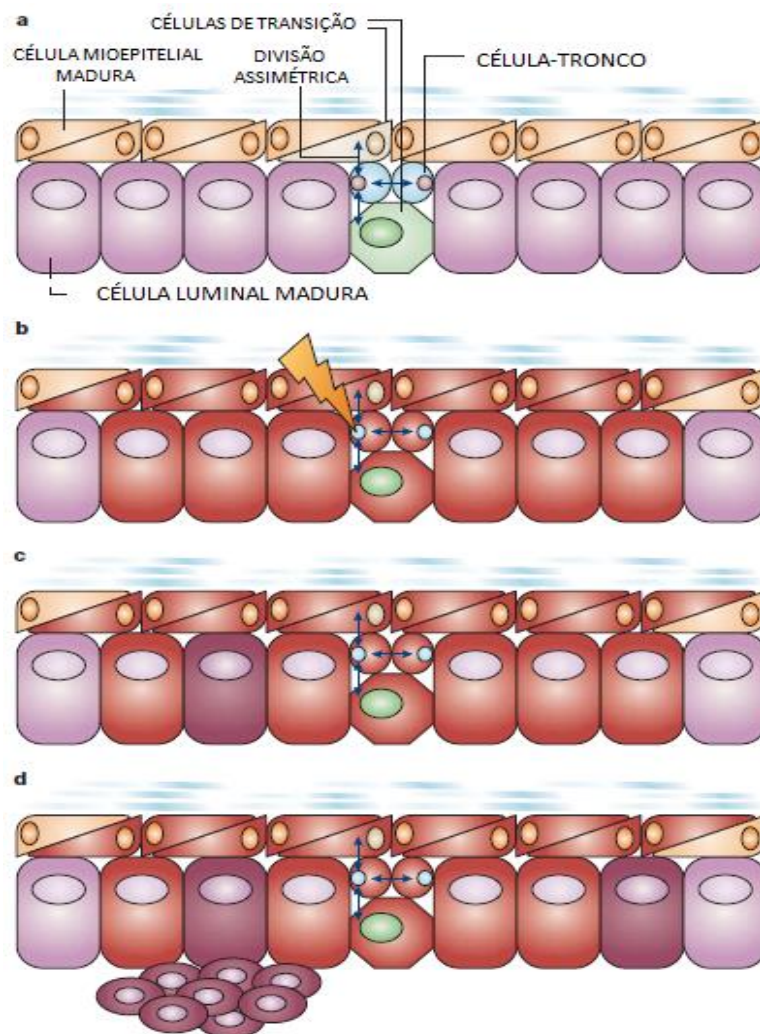
chamadas CSCs, criou grande entusiasmo na comunidade de pesquisa. De acordo com Clevers (2011), o conceito central das CSCs é a observação de que nem todas as células dos tumores são iguais. Atualmente, o conceito CSC postula que, semelhantemente ao crescimento de tecidos normais proliferativos, tais como a medula óssea, pele ou epitélio intestinal, o crescimento dos tumores é alimentado por um número limitado de CT dedicadas, que são capazes de realizar auto-renovação. A grande atração do conceito de CSC está nas explicações que ele fornece para vários fenômenos clínicos mal compreendidos.

CSCs são tacitamente acreditáveis por possuírem habilidades moleculares já conhecidas de células-tronco normais. As CSCs possuem auto-renovação, alta longevidade, resistência às agressões químicas e eletromagnéticas, podem dispor de longos períodos de quiescência e colonizar outras partes do corpo. Assim, a hipótese CSC pode explicar o que é comumente observado na clínica médica: onde pessoas com câncer, geralmente não são consideradas curadas, mesmo quando a sua resposta inicial à radio ou quimioterapia é fortemente encorajadora (CLEVERS, 2011).

Em 2003, Al-Hajj e colaboradores evidenciaram a existência de CSCs de mama. CTs, são células com capacidade de auto-renovação, podendo gerar células-filhas que podem se diferenciar em várias linhagens de células que são encontrados no tecido maduro, assim explicam de forma consistente o “campo de cancerização” (BRAAKHUIS *et al.*, 2003), ilustrado na Figura. 3, onde as CTs aparecem sendo as células de iniciação do tumor.

De acordo com Smalley e Ashworth (2003), o conceito “campo de cancerização” sugere que campos pré-neoplásicos de células podem se desenvolver a partir de uma origem clonal, em uma única célula original com uma mutação. Tal mutação seria fenotipicamente silenciosa, mas seria um fator de predisposição ao desenvolvimento neoplásico a todas as células do campo, ainda que tivessem pouco tempo de duração. Assim, mesmo uma única mutação em uma CT poderia gerar um campo propenso ao câncer, levando a tumores aparentemente independentes em sítios próximos (Figura 3). As células no campo pré-neoplásico possuem uma vantagem sobre as células fora do campo, no entanto, vantagens adicionais ainda devem ocorrer. A análise da perda de heterozigose (LOH) em tecidos mamários têm apresentado

evidências para alterações genéticas comuns em células epiteliais luminais e mioepiteliais, o que indica uma mutação em uma CT comum que deu origem a um campo de progênes mutantes (LAKHANI *et al.*, 1999). Segundo Smalley e Ashworth (2003), o mais extremo caso de “campo de cancerização” seria a herança de uma mutação da linha germinativa em um gene supressor de tumor, como *BRCA2* ou *TP53*. Nesse caso, o campo compreende o corpo como um todo.

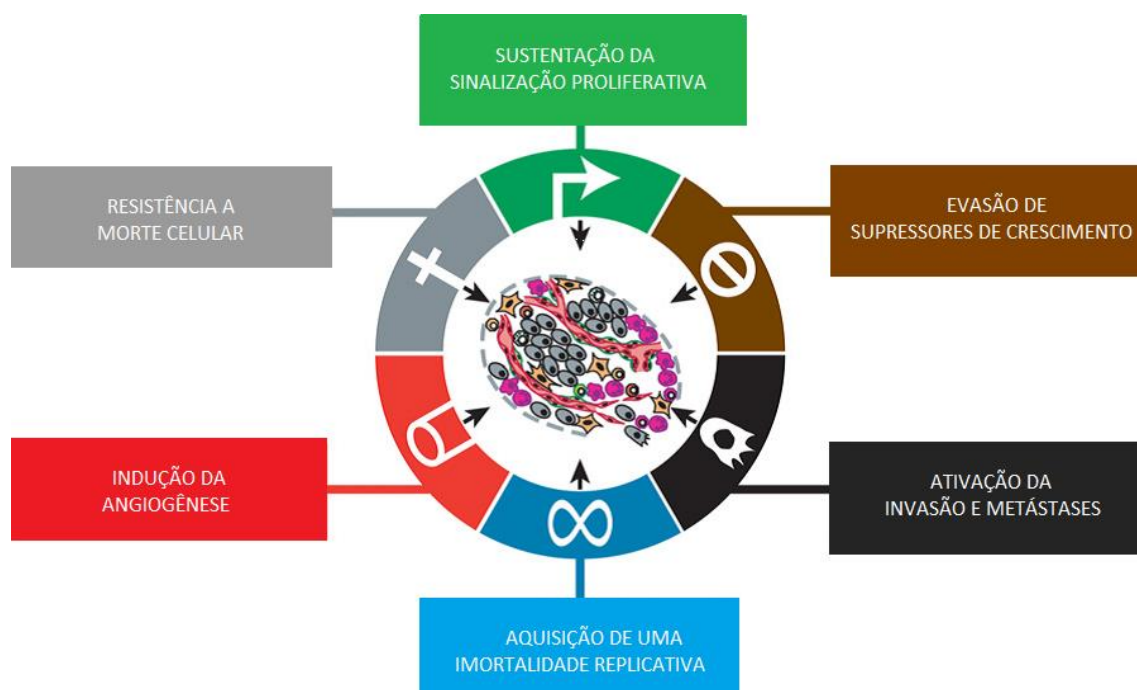


**FIGURA 3. “Campo de cancerização”.** a) As células-tronco se dividem (setas) para se auto-renovarem e gerar uma rota de células em replicação (célula verde) que ao final diferenciam-se em células mioepiteliais e luminais maduras. b) Uma mutação em uma célula-tronco (seta amarela) resulta em um campo de transição, culminando em células diferenciadas que carregam a mutação (células vermelhas). Sendo esta, no entanto, clinicamente silenciosa. c) Se o campo de transição e as células finalmente diferenciadas têm um tempo de eliminação lento - ou se a mutação original afeta a estabilidade do DNA ou a fidelidade da replicação - então um grande número de células se tornam alvos de mutações secundárias (células marrons). d) O aumento do número de células transportando várias mutações, aumenta as chances de que alguma delas desenvolva novas mutações, resultando numa doença clinicamente aparente.

**FONTE:** Smalley e Ashworth, 2003 (modificado).

Hanahan e Weinberg (2000), propuseram, como ilustrado na Figura 4, propriedades adquiridas pelo câncer para manutenção do processo maligno. Estas propriedades, constituem juntas, um princípio de organização que fornece um quadro lógico para compreender a notável diversidade de doenças neoplásicas, sugerindo uma noção de como as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico. A compreensão de um processo de múltiplos passos para a patogênese de tumores humanos, poderia ser racionalizada pela necessidade de células cancerosas incipiente adquirirem as características que lhes permitam tornar-se tumorigênicas e finalmente, malignas (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Embora, na continuidade das pesquisas com câncer, novas observações tenham modificado esta formulação original, de acordo com Hanahan e Weinberg (2011), as seis propriedades, distintas e complementares, de capacidades adquiridas pelo câncer que permitem o crescimento tumoral e disseminação metastática, continuam a fornecer uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer.



**FIGURA 4. “Propriedades” do câncer.** A ilustração apresenta seis “propriedades” das capacidades adquiridas pelo câncer: sustentação de sinais proliferativos, evasão dos supressores de crescimento, resistência a morte celular, angiogênese, imortalização replicativa e, invasão e metástase; sendo originalmente propostas por Hanahan e Weinberg (2000).

**FONTE:** Hanahan e Weinberg, 2011 (modificado).



Hanahan e Weinberg (2011) descrevem os tumores como mais do que massas insulares de proliferação das células cancerosas, tecidos complexos, constituídos por vários tipos de células diferentes que participam em interações heterotípicas umas com as outras. As células normais associadas ao estroma do tumor são consideradas participantes ativas na tumorigênese, uma vez que este estroma contribui para o desenvolvimento e expressão de certas destas “capacidades” adquiridas.

Durante a década que se seguiu entre os dois trabalhos de Hanahan e Weinberg (2000; 2011), esta noção foi sedimentada e estendida, revelando que a biologia dos tumores deve englobar as contribuições do microambiente do tumor para a tumorigênese e não ser entendida simplesmente, enumerando apenas as características das células do câncer.

Dentre estas seis propriedades de capacidades adquiridas pelo câncer, ao longo da progressão tumoral, a ativação de invasão e metástase compreende um importante estágio dentro da progressão tumoral no câncer de mama, uma vez que as altas taxas de mortalidade são devidas à invasão adjacente seguida pela propagação, à distância, das metástases mamárias.

#### **2.4.1 Metastatização**

Mais de 90% das mortes por câncer de mama relatadas, não são causadas pelo tumor primário e sim por suas metástases mamárias em sítios distantes (SPORN, 1996; GUNASINGHE *et al.*, 2012; NOLA *et al.*, 2012;). Em muitos tipos de tumores, a presença de metástases à distância marca o IV estágio e indica, quase invariavelmente, uma doença incurável com sobrevida, em geral, curta (SLEEMAN & STEEG, 2010). A metastatização é um processo complexo, com múltiplas etapas, no qual há um crescimento descontrolado de células tumorais que adquirem capacidades invasivas sobre o tecido adjacente, indo colonizar um novo sítio à distância (CARMONA *et al.*, 2012; NOLA *et al.*, 2012), promovendo alterações nas funções vitais dos órgãos afetados.

Metástases formadas por células de câncer que deixaram a massa tumoral primária, alcançam, através do sangue e linfa, novos locais para colonizar. Tais células migratórias são as manifestações mais agressivas do processo do câncer (NICOLSON, 1993).

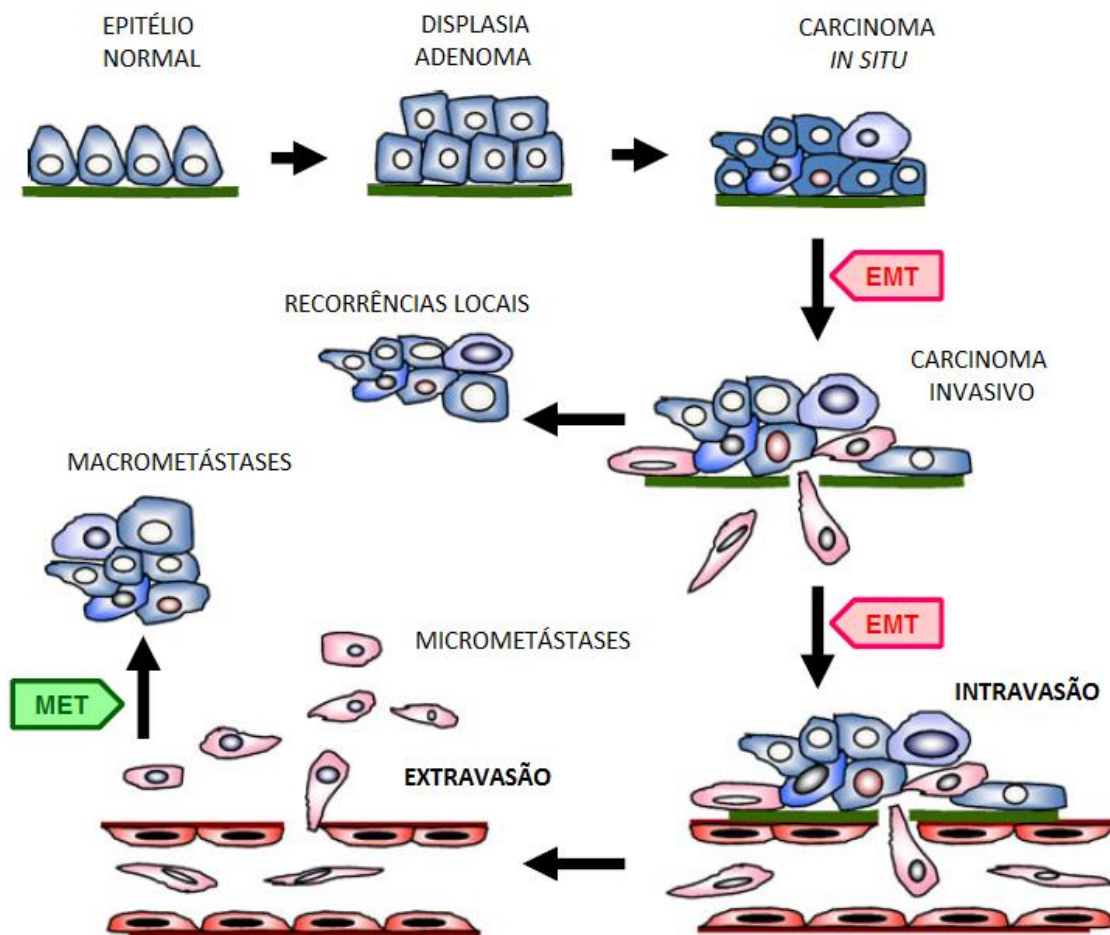
Segundo Nicolson (1993), as metástases tumorais desenvolvem-se, muito provavelmente, como uma consequência da interação entre células selecionadas do tumor e um ambiente de apoio. Células malignas, que exibem a capacidade para se metastatizar para um determinado órgão, detêm uma variedade de propriedades favorecendo a sua invasão e crescimento no tecido colonizado, as quais incluem, o aumento da adesão das células do endotélio microvascular do órgão; maior capacidade de resposta a sinais quimiotáticos liberados pelos órgãos-alvo e; aumento da resposta local ou a sinais de crescimento tecido-associado no órgão-alvo. Os órgãos-alvos também devem possuir características adequadas para a entrada e crescimento bem-sucedido das células tumorais metastáticas. Estas, incluem um tipo apropriado de endotélio microvascular, estroma ou matriz do órgão e a presença de fatores parácrinos de motilidade e de crescimento.

A motilidade das células tumorais é uma habilidade fundamental no processo que conduz a formação das metástases. As células de tumor que têm o potencial metastático aumentado são mais móveis do que as células tumorais não-metastáticas. O aumento da motilidade de células tumorais pode promover a disseminação aleatória das células tumorais. No entanto, alguns tumores malignos formam metástases preferencialmente em órgãos distantes, sugerindo um papel crucial do microambiente do órgão para a colonização e proliferação das células tumorais metastáticas (WANG *et al.*, 1998).

O gene CXCR4, codifica uma quimiocina bem conhecida envolvida no cancer de mama (RAMOS *et al.*, 2011). A quimiocina CXCR4, em conjunto com CXCL12, está envolvida no mecanismo de metástases do câncer de mama. As quimiocinas são caracterizadas por sua capacidade de induzir a migração direcional de leucócitos (WANG *et al.*, 1998). No entanto, têm sido relatadas envolvidas no crescimento e metastatização de tumores malignos. Células de tumores primários de mama que superexpressam CXCR4, são atraídas por células que expressam CXCL12 no pulmão, linfonodos, fígado ou ossos, o que leva a metástases de células tumorais isoladas (MULLER *et al.*, 2001). Assim, as metástases mamárias ocorrem frequentemente nestes órgãos, enquanto que em outros, são raramente observadas.

Ao nível biológico, nosso entendimento sobre metástases avançou grandemente ao vê-las como uma série de etapas distintas que juntas

compreendem a “cascata de invasão-metástase” (FIDLER, 2002; 2003; GEIGER & PEEPER, 2009; TALMADGE & FIDLER, 2010). Como ilustrado na Figura 5, o primeiro passo é a invasão localizada que permite às células do tumor primário *in situ* invadir tecidos adjacentes. Em carcinomas, isto requer o rompimento da membrana basal, que limita o compartimento epitelial. Em seguida, as células tumorais devem acessar vasos sanguíneos e linfáticos, entrando no lúmen destes vasos (intravasamento) aonde devem sobreviver ao longo do transporte. Estes vasos podem transportar as células de câncer para locais anatomicamente distantes, onde permanecem temporariamente até realizarem a saída do vaso (extravasamento) e formar micrometástases dormentes. Finalmente, em um processo denominado colonização, pequenos aglomerados de células ou células tumorais disseminadas isoladamente (micrometástases), devem adquirir a capacidade para sobreviver e proliferar no microambiente de um tecido estranho, a fim de formar metástases macroscópicas (SHEEL & WEINBERG, 2012). Em todas estas etapas, fica evidente uma maior motilidade e plasticidade (fenótipo mesenquimal) promovendo o movimento da massa tumoral para o tecido (WELLS *et al.*, 2011). Salienta-se que todo o processo tem uma baixa probabilidade de ser complementado pela dificuldade de sucesso em todos os passos sucesso (WEINBERG, 2008).



**FIGURA 5. Cascata de invasão-metástase.** i) A cascata de invasão-metástase relaciona seis passos básicos de todo o processo: invasão localizada, intravasamento, transporte, extravasamento, formação de micrometástases e colonização (formação de macrometástases). ii) A ilustração elabora os eventos sequenciais de EMT e MET, que em hipótese, desempenham papel na progressão do câncer de mama. Células epiteliais normais passam por uma série de transformações até se tornarem malignas. A proliferação clonal de células malignas dá origem ao carcinoma invasivo. Algumas destas células invadem tecidos locais promovendo recorrências locais, enquanto outra fração sofre EMT e realizam o intravasamento para os vasos sanguíneos próximos. Estas células podem permanecer na circulação como células do tumor circulantes (CTCs) ou promover o extravasamento em um sítio distante. As células tumorais extravasadas podem permanecer dormentes como células do tumor disseminadas (DTCs) ou micrometástases, formando posteriormente macrometástases pelo mecanismo reverso, MET.

**FONTE:** Gunasinghe *et al.*, 2012 (modificado).

Para realizar esta cascata, as células do tumor precisam adquirir propriedades individuais que juntas caracterizem este processo. Para isto, existe um programa celular biológico e multifacetado que capacita as células do carcinoma à adquirirem os traços requeridos para completar as etapas iniciais da cascata metastática (SHEEL & WEINBERG, 2012). Este processo é conhecido como transição epitelial-mesenquimal (EMT).

A EMT representa um programa celular que confere às células do epitélio neoplásico os traços biológicos necessários para completar a maioria das etapas da cascata de invasão-metástase (ACLOQUE *et al.*, 2009; THIERY *et al.*, 2009; SINGH & SETTLEMAN, 2010), regulando o desenvolvimento metastático. Este programa celular destaca-se como um meio pelo qual as células epiteliais transformadas dos carcinomas podem adquirir a capacidade para invadir, resistir a apoptose e se disseminar (KLYMKOWSKY & SAVAGNER, 2009; POLYAK & WEINBERG, 2009). Como este mesmo processo está envolvido em várias etapas da morfogênese embrionária e cicatrização de lesões, as células do carcinoma podem adquirir concomitantemente múltiplos atributos que lhes permitam invadir e metastatizar. A EMT pode ser ativada temporariamente ou de forma estável, e em diversos graus, pelas células do carcinoma, durante o curso de invasão e metástase.

A característica de auto-renovação, parece também ser essencial ao longo deste processo. Tais células de auto-renovação têm sido descritas em várias neoplasias, onde são denominadas células-tronco do câncer (CSCs). Parece plausível que o mesmo traço de iniciação do tumor associado com as CSCs, anteriormente abordado, seja crítico também para a capacidade das células do câncer se disseminarem, servindo como fundadoras de novas colônias (SHEEL & WEINBERG, 2012).

Biologicamente importante, a ativação do programa EMT tem sido associada com a aquisição de traços de células-tronco (CT) por células normais e neoplásicas (MANI *et al.*, 2008; MOREL *et al.*, 2008). Evidências atuais indicam que a conexão EMT-CT vale para ambas as populações de células epiteliais normais e do carcinoma (MANI *et al.*, 2008; SHIMONO *et al.*, 2009). Isto sugere que populações de células neoplásicas não precisam inventar programas de CT para adquirirem subpopulações delas. Os programas de EMT parecem proporcionar uma fonte pronta de CSCs, permitindo a desdiferenciação das células epiteliais dentro dos carcinomas. Assim, as células do carcinoma podem se apropriar dos programas de CT que já estavam operando nas suas populações ancestrais de células normais.

Esta conexão entre EMT e CTs epiteliais indica que o processo de EMT é duplamente perigoso para a paciente com câncer: primeiro por transmitir

características mesenquimais para as células do carcinoma, e segundo, porque uma EMT pode gerar traços celulares associados com alto grau de malignidade incluindo a motilidade, a capacidade de invasão e a resistência à apoptose, levando à disseminação metastática (SINGH & SETTLEMAN, 2010).

Um conjunto de proteínas reguladoras, que atuam pleiotropicamente, orquestram a EMT. De acordo com Peinado e colaboradores (2004), entre as características biológicas envolvidas nos processos de invasão e metástase das células, que são dirigidas por tais proteínas reguladoras, estão a perda de junções aderentes e conversão associada de uma morfologia epitelial para uma mesenquimal com a expressão de enzimas que degradam a matriz, aumentam a motilidade e elevam a resistência a apoptose. Várias dessas proteínas reguladoras podem reprimir diretamente a expressão gênica de E-caderina, privando, assim, células epiteliais neoplásicas deste supressor chave da motilidade e invasão.

Um processo oposto ao inicial (EMT) ocorre no sítio do tumor primário: a transição mesenquimal-epitelial (MET), que ocorre na etapa de colonização e é um dos mecanismos considerados fundamentais para a colonização das células disseminadas, no sítio secundário (HUGO *et al.*, 2007; CHAO, SHEPARD & WELLS, 2010).

Portanto, fica cada vez mais evidente que a comunicação entre células cancerosas e células do estroma neoplásico está envolvida na aquisição da capacidade de crescimento invasivo e metástases (EGEBLAD, NAKASONE & WERB, 2010; QIAN & POLLARD, 2010).

Glinsky (2006) resumiu dados que compreendem uma “assinatura de morte por câncer” apresentada por células que manifestavam um perfil de expressão gênica de linhagem de células-tronco, exibindo características tais como: 1) aumento da expressão de certos membros de proteínas inibidoras de apoptose; 2) ativação de proteínas do *checkpoint* do fuso mitótico e; 3) elevados níveis de certas proteínas reguladoras do ciclo celular. Conseqüentemente, estas células de câncer poderiam adquirir habilidades metastáticas, sendo aneuplóides, resistentes a *anoikis* (tipo de morte celular programada que é induzida em células dependentes de ancoragem que apresentam ausência de interação célula-matriz e se destacam da matriz extracelular) e apresentando controle do ciclo celular anômalo. A Ciclina D1 foi

relacionada dentre as proteínas do terceiro ponto, na análise funcional de genes relacionados à morte por câncer. Devido a sua função no controle do ciclo celular, foi considerada um componente de “hiperatividade” no *checkpoint* do ciclo celular em células-tronco de câncer metastático. O aumento da expressão de Ciclina D1 potencializa a ação inibitória de p21<sup>Cip1</sup> sobre a Ciclina E, que, por sua vez, ativa CDK2 desencadeando a transição G<sub>1</sub>/S e levando à progressão do ciclo celular.

## 2.5 Ciclina D1

A proteína Ciclina D1 é codificada pelo gene *CCND1* (também referido como *BCL1* ou *PRAD1*). Esta proteína pertence à família das ciclinas, que é altamente conservada e cujos membros são caracterizados por uma periodicidade, na abundância das proteínas ao longo do ciclo celular (SHERR & ROBERTS, 2004; MALUMBRES & BARBACID, 2009). Seu papel na regulação da progressão do ciclo celular através da transição de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> para fase S (SHERR, 1993; BIÈCHE *et al.* 2002; MASSAGUE, 2004; SHERR & ROBERTS, 2004; MALUMBRES & BARBACID, 2009), é bem estabelecido.

A regulação da transição G<sub>1</sub>/S é interrompida em quase todos os cânceres, devido à sua íntima função na integração entre os sinais de fatores de crescimento e o ciclo celular. Das moléculas reguladoras de G<sub>1</sub>, o complexo Ciclina D1-CDK4/6 apresenta-se desregulado, com alta frequência, em quase todos os cânceres, direcionando-o para uma contribuição direta no crescimento e transformação neoplásica (KIM & DIEHL, 2009).

Segundo Motokura e Arnold (1993), o gene *CCND1* tem sido identificado como um oncogene, apresentando rearranjos cromossômicos, ampliações gênicas, mutações e superexpressão em uma variedade de tumores. A superexpressão da Ciclina D1 é conhecida e associada à fase inicial do câncer e risco de progressão tumoral e metástases (BARTKOVA *et al.*, 1994; BARNES & GILLET, 1998; AMANATULLAH *et al.*, 2001; DIEHL, 2002; STACEY, 2003; CHUNG, 2004; WANG *et al.*, 2004), sendo descrita com alta frequência em uma variedade de carcinomas incluindo os de mama, esôfago e pâncreas (BETTICHER *et al.*, 1995; BANI-HANI *et al.*, 2000; KONG *et al.*, 2000; DIEHL, 2002). Em linfoma de células do manto (LMC), a superexpressão da Ciclina D1 é bem estabelecida e decorre de uma translocação cromossômica t(11;14), que

justapõe o *locus* do gene da cadeia pesada da imunoglobulina com o *locus* do gene *CCND1*, sendo um critério diagnóstico da doença. (TSUJIMOTO *et al.*, 1984; VOSE, 2013)

A relevância funcional do gene *CCND1* para o câncer ficou clara desde a sua identificação, em 1991 (MOTOKURA *et al.*, 1991). Esforços adicionais desde então, têm tentado elucidar os mecanismos precisos de como a Ciclina D1 está diretamente associada à tumorigênese (WIESTNER *et al.*, 2007; KIM & DIEHL, 2009; MUSGROVE *et al.*, 2011; PESTELL, 2013; CASIMIRO *et al.*, 2014). Considerando que este gene, há anos, tem sido alvo de muitos estudos, relataremos nesta revisão, dados relacionados à Ciclina D1 desde a década de 90, após sua descoberta, até novas funções descritas no início de 2014.

### **2.5.1 Estrutura gênica (*CCND1*)**

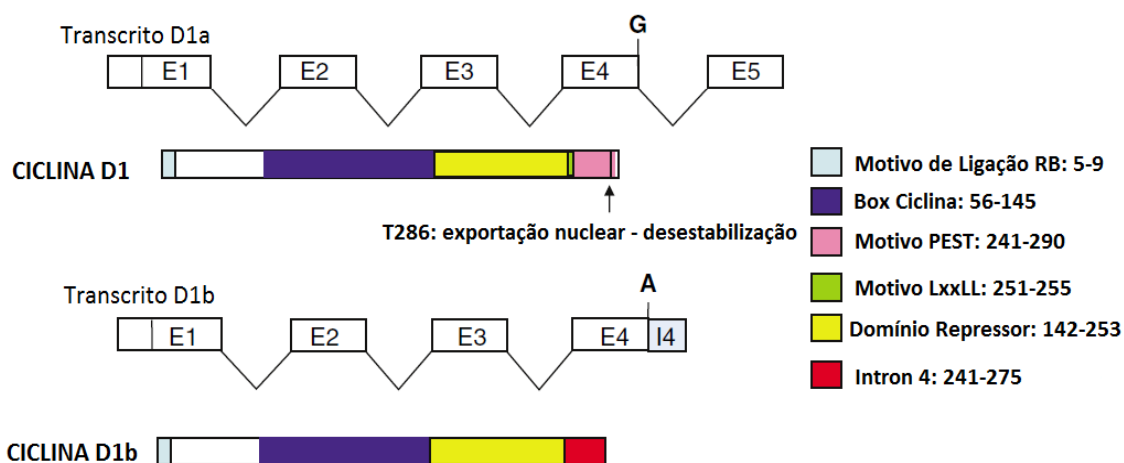
O gene humano *CCND1* foi, inicialmente, clonado a partir de um ponto de quebra de rearranjo cromossômico em adenomas da paratireóide (MOTOKURA *et al.*, 1991). Está localizado em 11q13 e possui cinco exons (MOTOKURA & ARNOLD, 1993), os quais podem ser alternativamente processados, resultando em duas isoformas: Ciclina D1a e Ciclina D1b (HOSOKAWA *et al.*, 1997; LU, GLADDEN & DIEHL, 2003; FU *et al.*, 2004).

O transcrito alternativo, D1b, foi identificado em 1995 (BETTICHER *et al.*, 1995), porém, o transcrito D1a é definido como a Ciclina D1, originalmente relatada (MOTOKURA *et al.*, 1991). O mRNA para a isoforma Ciclina D1a tem 4,5Kb de comprimento, com uma região codificante de apenas 882pb, logo a maior parte deste mRNA é composta de sequências 3' UTR. O mRNA para a isoforma Ciclina D1b não tem o exon 5, mas retém o intron 4 (Figura 6), o qual contém um códon de término depois de 99pb e um sinal de poliadenilação a menos de 300pb deste códon de término, resultando numa forma truncada de Ciclina D1. O mRNA de 1,7Kb da Ciclina D1b é encontrado na maioria dos tumores e linhagens celulares que expressam Ciclina D1. Este, codifica uma proteína com 274 aminoácidos que difere, no domínio C-terminal, da proteína de 294 aminoácidos codificada pelo mRNA da isoforma Ciclina D1a (BETTICHER *et al.*, 1995; HOSOKAWA *et al.*, 1997; LU, GLADDEN & DIEHL, 2003; SOLOMON *et al.*, 2003; KNUDSEN *et al.*, 2006). Contrastando com a Ciclina D1a, a isoforma D1b apresenta potencial capacidade para levar à



transformação celular em modelos experimentais (LU, GLADDEN & DIEHL, 2003; SOLOMON *et al.*, 2003).

Como ilustrado na Figura 6, a proteína Ciclina D1 é composta pelos domínios: Motivo de Ligação RB (na extremidade amino-terminal), onde realiza sua interação com a proteína pRb; Box Ciclina, que medeia a ligação com as CDKs, sendo necessária também, para a interação com as inibidoras de CDKs; Motivo PEST (domínio C-terminal), rico em prolina, glutamato, serina e threonina, responsável por sua degradação (contém o T286) e; um resíduo Threonina (T286), próximo a extremidade C-terminal, que, quando fosforilado, desencadeia a degradação mediada por ubiquitina e promove a exportação nuclear da Ciclina D1. A região entre o Box Ciclina e a extremidade C-terminal, contém domínios que são responsáveis pela interação TFs-Ciclina D1 (Domínio Repressor), sendo relativamente pouco conservada. Um domínio de interação chave na extremidade C-terminal é o Motivo rico em Leucina (LxxLL), que se liga aos receptores esteróides (MUSGROVE *et al.*, 2011). A Ciclina D1b, ao reter o intron 4 no lugar do exon 5, configura uma estrutura sem os Motivos PEST, com o resíduo T286, e LxxLL e portanto é refratária a exportação nuclear e degradação (KNUDSEN *et al.*, 2006).



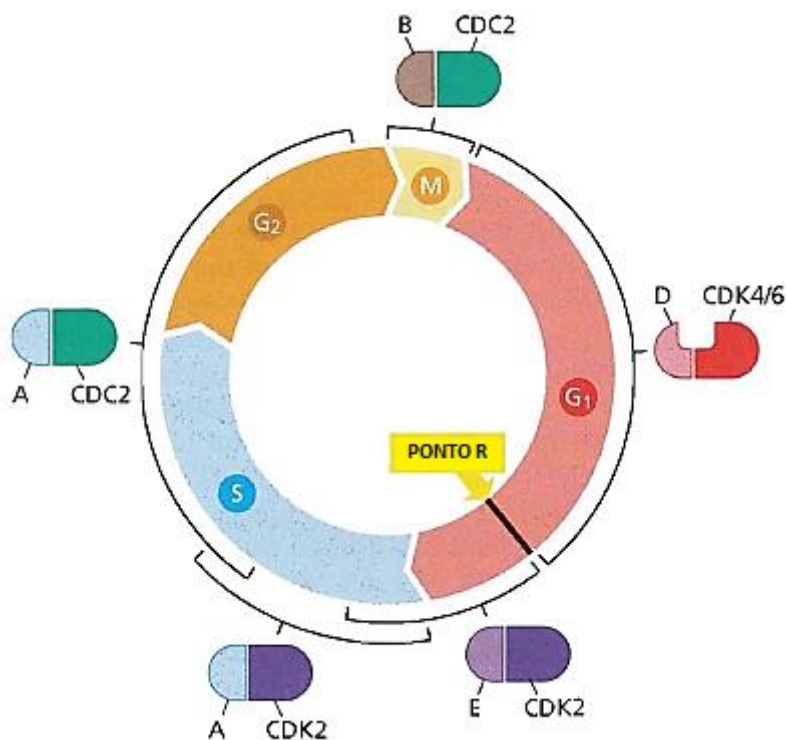
**FIGURA 6. Estrutura da Ciclina D1 (D1a) e Ciclina D1b.** Domínios predominantes nas isoformas e suas localizações entre a sequência primária de Ciclina D1 e D1b, são ilustradas nesta figura.

**FONTE:** Knudsen *et al.*, 2006 (modificado).

### **2.5.2 Ciclina D1 e o controle do ciclo celular**

Por meio de estudos em diversos organismos eucariotos, têm-se demonstrado que a progressão através do ciclo celular é impulsionada pela ativação e inativação de cinases-dependentes de ciclina (CDK), que desencadeiam a transição para as fases subsequentes do ciclo celular (SHERR & ROBERTS, 2004; van den HEUVEL, 2005). CDKs são proteínas serina/treonina cinases que necessitam da associação com uma subunidade reguladora ciclina, para a sua ativação. Vários níveis de regulação incidem sobre as CDKs para impor um controle rígido sobre a progressão do ciclo celular (SHERR & ROBERTS, 2004; MALUMBRES & BARBACID, 2009). Essa regulação envolve a expressão e destruição controlada das ciclinas, ativação/inibição da fosforilação/desfosforilação das CDKs e expressão e destruição de proteínas inibidoras que se associam às CDKs ou aos complexos Ciclina-CDK (van den HEUVEL, 2005).

De acordo com Kim e Diehl (2009), as ciclinas funcionam como subunidades reguladoras alostéricas sobre as CDKs. Enquanto as CDKs são normalmente expressas em todos os momentos do ciclo celular, as ciclinas se acumulam periodicamente no ponto em que se associam a sua CDK correspondente, formando holoenzimas (complexos Ciclina-CDK) (SHERR & ROBERTS, 2004; MALUMBRES & BARBACID, 2009). Estas holoenzimas são as formas ativas, na qual as CDKs fosforilam diferentes substratos, provocando a transição de fases distintas ao longo do ciclo celular. São os complexos ciclina-CDK que constituem o motor do relógio do ciclo celular (Figura 7).



**FIGURA 7. Holoenzimas responsáveis pela progressão do ciclo celular.** A figura ilustra os complexos formados pelas ciclinas e suas CDKs correspondentes (holoenzima) e seu período de atuação nas fases do ciclo celular. O esquema também evidencia o ponto R, ao final de G<sub>1</sub>. **FONTE:** Weinberg, 2008 (modificado).

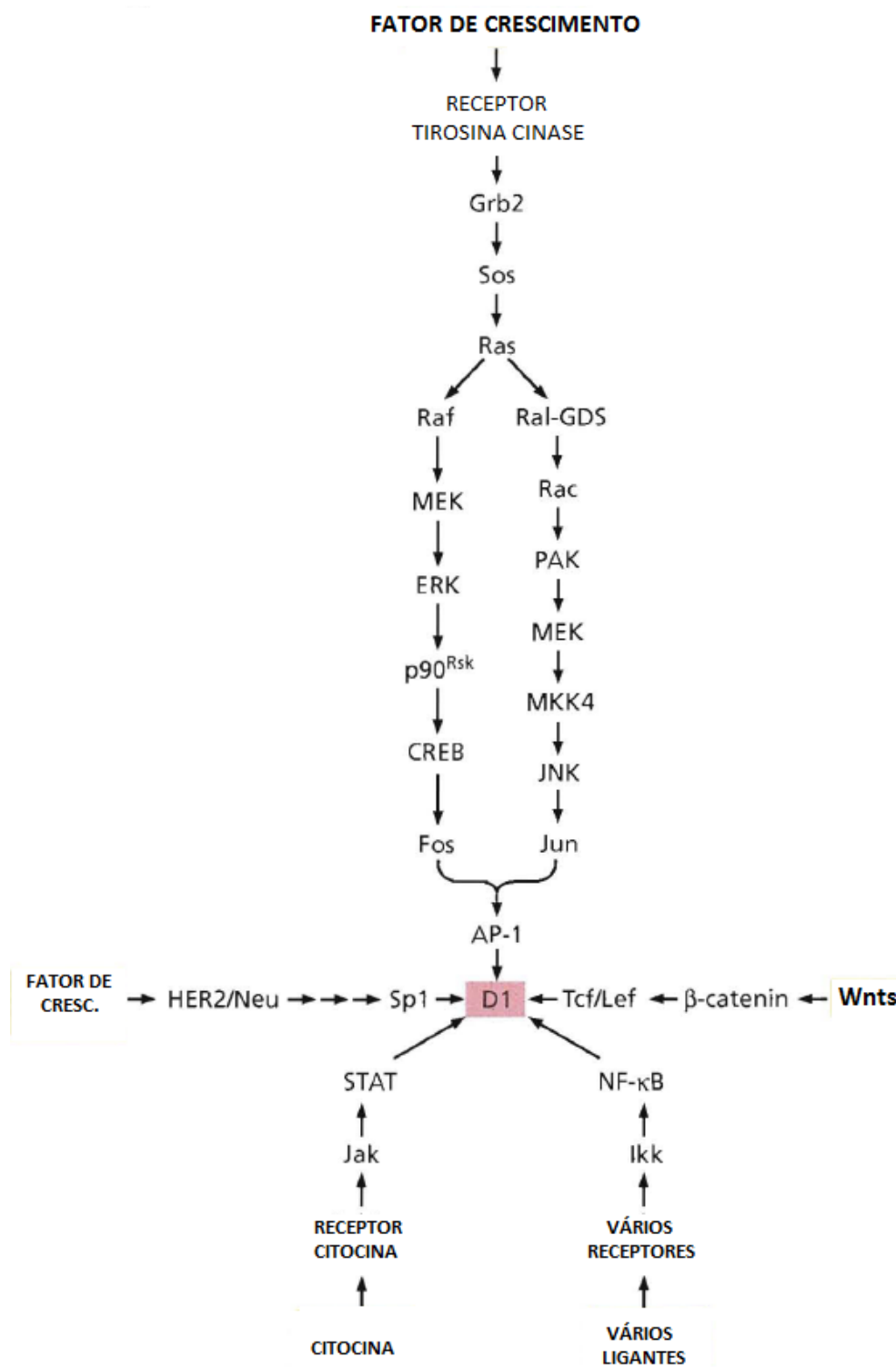
Diferentemente das outras ciclinas (A, B e E) que compõem o relógio do ciclo celular e apresentam variações bem programadas em seus níveis ao longo dele, os níveis das ciclinas tipo D são controlados por sinais extracelulares, especificamente aqueles transportados por fatores mitogênicos. O comportamento variável das ciclinas tipo D tem sido associado a uma função no transporte de sinais do meio extracelular para o relógio do ciclo celular, operante no núcleo (SHERR & ROBERTS, 2004; MALUMBRES & BARBACID, 2009).

Ciclinas do tipo D são ciclinas específicas da fase G<sub>1</sub> e associam-se a CDK4 ou CDK6, promovendo (em conjunto com a Ciclina E-CDK2) a progressão pelo ponto R (ponto de restrição) ao final de G<sub>1</sub> (SHERR, 1993) (Figura 7). Três ciclinas constituem a família do tipo D (D1, D2 e D3) (SHERR, 1993; MASSAGUE, 2004; SHERR & ROBERTS, 2004), cujos promotores estão sob o controle de um grupo diferente de receptores de superfície. A regulação da Ciclina D1, dependente de fatores mitogênicos, tem sido a mais compreendida (KIM & DIEHL, 2009).

A expressão e acúmulo da Ciclina D1 são induzidos por fatores de crescimento e ocorrem em vários níveis, incluindo aumento da transcrição, tradução e estabilidade da proteína. A regulação é mediada principalmente através de vias de sinalização *Ras* (MUSGROVE, 2006).

A exposição das células aos estímulos mitogênicos, ativa os receptores tirosina cinase que desencadeiam, entre outras, uma cascata de sinalização sequencial envolvendo Ras-Raf-MEK-ERK resultando na regulação positiva (*up-regulation*) da transcrição da Ciclina D1 (WEBER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1998; AMANATULLAH *et al.*, 2001). O promotor do gene *CCND1* tem sítios para a ligação de vários fatores de transcrição, entre eles AP-1, Tcf/Lef e NF- $\kappa$ B, que, por sua vez, são ativados por uma série de fatores de crescimento (SHERR & ROBERTS, 2004) (Figura 8).

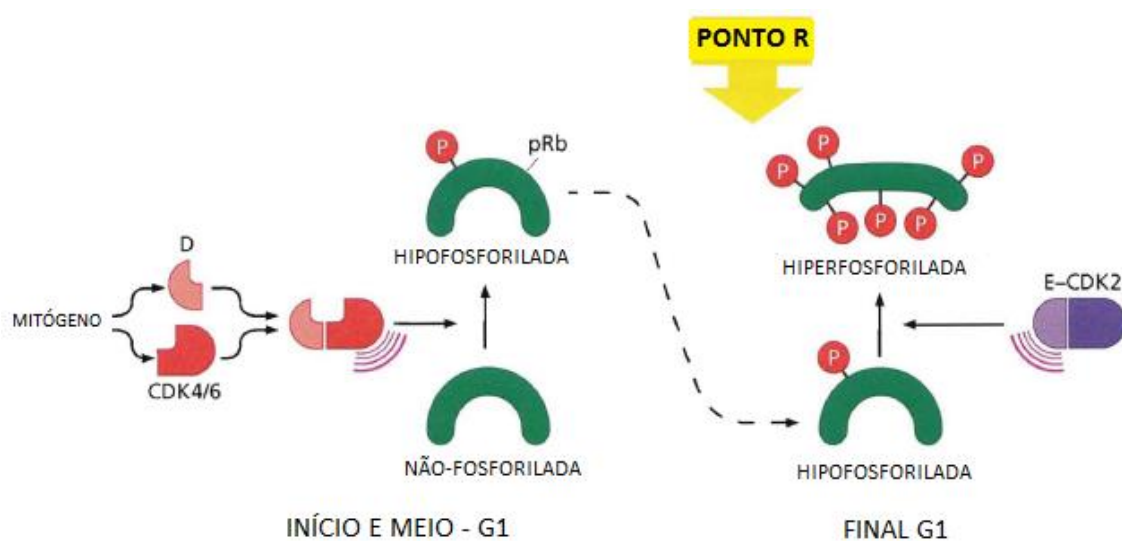
O aumento da transcrição é acompanhado pelo aumento da tradução e redução da proteólise, que são acionados por meio de outras vias mediadas por Ras envolvendo PI3K e Akt, potencializando a indução de Ciclina D1. O aumento da tradução da Ciclina D1 é mediado pela cascata PI3K-Akt-mTOR-S6K (MUISE-HELMERICKS *et al.*, 1998; KOZICZAK & HYNES, 2004), enquanto a via direta de degradação envolve PI3K-Akt-GSK3 $\beta$  (DIEHL *et al.*, 1998). A fosforilação de GSK3 $\beta$  é mediada por Akt e diminui a atividade catalítica de GSK3 $\beta$ , o que inibe a exportação nuclear e degradação citoplasmática de Ciclina D1, resultando no seu acúmulo no núcleo celular durante a fase G<sub>1</sub> (DIEHL *et al.*, 1998; KIM & DIEHL, 2009).



**FIGURA 8. Controle do nível da Ciclina D1.** O controle dos níveis de Ciclina D1 por mitógenos extracelulares pode ser explicado, em parte, por uma cascata de transdução de sinais que parte de receptores para fatores de crescimento até o fator de transcrição AP-1, um dos vários fatores de transcrição que modulam a transcrição do gene *CCND1* no núcleo. Como indicado, várias cascatas de sinalização diferentes convergem para o promotor deste mesmo gene.

**FONTE:** Weinberg, 2008 (modificado).

Na sequência de sua indução por fatores de crescimento mitogênicos, a Ciclina D1 recém-sintetizada associa-se às CDK4/6 para exercer a função da holoenzima Ciclina D1-CDK4/6 na inativação, dependente de fosforilação, da pRB, como ilustra a Figura 9. A fosforilação da pRB é necessária para a ativação de uma rede de expressão de genes que regulam a passagem pelo ponto R e entrada na fase S (SHERR, 1993; MASSAGUE, 2004; SHERR & ROBERTS, 2004).



**FIGURA 9. Controle da transição pelo ponto R.** Os níveis das ciclinas tipo D são amplamente controlados por sinais extracelulares. As Ciclinas D1, juntamente com CDK4/6 são capazes de levar à hipofosforilação de pRB, que é um pré-requisito para a transição pelo ponto R, o que faz com que essa transição se torne sensível a sinais extracelulares. Esses processos são estendidos pelos complexos CiclinaE-CDK2 sobre a pRB hipofosforilada, que completa a inativação funcional da pRB por meio de sua hiperfosforilação.

**FONTE:** Weinberg, 2008 (modificado).

Segundo Weinberg (1995), a repressão da pRB pela sua hiperfosforilação, iniciada pelo complexo Ciclina D1-CDK4/6, promove a liberação de fatores de transcrição da família E2F, necessários e suficientes, para a progressão do ciclo celular. Além da pRB desfosforilada aprisionar E2F, impedindo que este fator transcricional execute sua função nos promotores gênicos, inclusive do gene da Ciclina E, ela se associa às histonas desacetilases (HDACs) promovendo a remodelação da cromatina para reprimir a atividade de E2F no promotor da Ciclina E (FU *et al.*, 2004).

Além disso, a Ciclina D1 desempenha outro papel importante (independente de cinase) para a transição G<sub>1</sub>/S, sequestrando os inibidores de CDK, como o p27<sup>Kip1</sup> e p21<sup>Cip1</sup>, para a ativação dos complexos Ciclina E/CDK2

que continuam a fosforilar a pRB ao final de G<sub>1</sub> (POLYAK *et al.*, 1994; SHERR & ROBERTS, 1999; WEINBERG, 2008). Curiosamente, Cheng e colaboradores (1999) relatam que esta ligação com os inibidores p27<sup>Kip1</sup> e p21<sup>Cip1</sup> promove a estabilização da associação entre ciclina D1 e CDK4/6.

### 2.5.3 Outras funções da Ciclina D1

Além de suas funções, dependentes de CDK, diretamente ligadas ao controle do ciclo celular, a Ciclina D1 pode se ligar a outras CDKs, que não as CDK4/6 e, atuar em outros processos fisiológicos cruciais. Outras funções bioquímicas importantes, independentes de CDK, também são desempenhadas pela Ciclina D1 (FU *et al.*, 2004).

Dentre os papéis cruciais desempenhados pela Ciclina D1, estão a co-regulação transcricional, através de sua interação direta aos fatores de transcrição ou mediante a sua associação às HATs e HDACs; a participação na migração e adesão celular de diversos tipos de células; a regulação da diferenciação celular de adipócitos e do metabolismo de gordura *in vivo*, bem como do metabolismo mitocondrial e; a indução de instabilidades cromossômicas e reparo ao dano no DNA.

Pestell (2013) descreve dentre os papéis já atribuídos à proteína Ciclina D1 uma nova função na regulação do genoma não-codificante.

#### Co-regulação transcricional

Embora a proteína pRb seja o principal substrato para o complexo CiclinaD1-CDK4, estudos recentes mostram que a Ciclina D1-CDK4 tem outros substratos relevantes em adição à família Rb. Estes incluem os fatores transcricionais (TFs) (MUSGROVE *et al.*, 2011). Mais de 35 TFs são regulados pela expressão de Ciclina D1. O mecanismo envolve o recrutamento direto de TFs ao DNA ou uma associação a reguladores de acetilação e metilação de histonas (FU *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2005). Hult e colaboradores (HULIT *et al.*, 2004) demonstraram o essencial papel da Ciclina D1 no recrutamento de TFs no sítio de ligação ao DNA.

Uma das principais funções não-catalíticas da Ciclina D1 é a regulação transcricional. O recrutamento da Ciclina D1 no local da cromatina, recruta por sua vez, PPAR $\gamma$  e HDAC entre outros (FU *et al.*, 2005). Segundo Pestell e

colaboradores (1999), tanto a Ciclina E quanto a D regulam a atividade de fatores de transcrição através de vários mecanismos.

De modo dependente de cinase, a CDK ativa, regula as funções de uma variedade de TFs, incluindo p53 (PESTELL, 2013); a família MEF2, os quais desempenham papéis na proliferação e diferenciação de linhagens celulares específicas (LAZARO, BAILEY & LASSAR, 2002) e; BRCA1, o qual coordena o reparo ao dano no DNA, ubiquitinação e a regulação transcricional para manutenção da estabilidade genômica. Outros alvos da CDK4 exercem papéis nos processos de replicação e segregação cromossomal do DNA, tal como duplicação e separação do centrôssomo, função mitocondrial e de crescimento celular (MUSGROVE *et al.*, 2011).

### **Migração**

Alguns substratos das CDK4/CDK6 têm papéis em processos celulares que estão envolvidos na motilidade e adesão celular e no remodelamento do citoesqueleto (ZHONG *et al.*, 2010). A Ciclina D1 desempenha essencial papel na migração celular em vários tipos de células incluindo macrófagos, fibroblastos e células do epitélio mamário (NEUMEISTER *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006). A diminuição desta proteína promove o aumento da adesão e a redução da migração (NEUMEISTER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006).

De modo independente de CDK, genes responsivos à Ciclina D1 incluem alguns que promovem migração e invasão, tal como trombospondina e o efetor Rho ROCK2 (LI *et al.*, 2006). Um outro papel não-catalítico, bem descrito da Ciclina D1, é o sequestro molecular dos inibidores de CDK, p21<sup>Cip1</sup> e p27<sup>Kip1</sup>, pelo complexo Ciclina D1-CDK4/6 durante a transição G<sub>1</sub>/S. Esta interação, além de ter importância na coordenação da atividade das CDKs durante a fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, permite algumas contribuições em outros processos celulares. A Ciclina D1 associada à p27<sup>Kip1</sup> pode contribuir para a migração independentemente de CDK4 (SHERR & ROBERTS, 1999). Similarmente, sua interação com p21<sup>Cip1</sup> contribui para sua função não-catalítica no reparo do DNA (MUSGROVE *et al.*, 2011).



### **Resposta ao dano no DNA (DDR)**

A Ciclina D1 regula a expressão de genes que estão envolvidos na replicação e *checkpoints* de dano ao DNA em fibroblastos e no epitélio mamário (FU *et al.*, 2005; SAKAMAKI *et al.*, 2006) e, também interage com um número de proteínas que estão envolvidas na resposta ao dano no DNA (DDR) (LI *et al.*, 2010; JIRAWATNOTAI *et al.*, 2011).

A proteína Ciclina D1 está implicada à resposta ao dano no DNA. Uma varredura proteômica para identificar proteínas que interagem com a Ciclina D1, apontou várias proteínas DDR, incluindo RAD51, uma recombinase envolvida na recombinação homóloga (RH) para o reparo de quebras fita-dupla no DNA. BRCA2 também foi identificada como uma proteína de interação com a Ciclina D1. Por se ligar a BRCA2 e RAD51, a Ciclina D1 facilita o recrutamento de RAD51 para o sítio de dano no DNA, promovendo assim o reparo por RH. Inesperadamente, BRCA2 reduz o recrutamento da Ciclina D1 aos sítios de dano ao DNA, no entanto, a diminuição da Ciclina D1 não afeta o recrutamento de BRCA2, mas sim o de RAD51. Assim, a regulação da replicação e/ou *checkpoints* de dano ao DNA não é única para a Ciclina D1 (LI *et al.*, 2010; JIRAWATNOTAI *et al.*, 2011).

Ambas as habilidades da Ciclina D1 tanto na facilitação da resposta ao dano no DNA, quanto na formação de RAD51 requer p21<sup>Cip1</sup> (LI *et al.*, 2010; RADERSCHALL *et al.*, 2002), sugerindo que p21<sup>Cip1</sup> pode também estar presente no complexo Ciclina D1/RAD51/BRCA2.

A facilitação do reparo ao DNA mediado por Ciclina D1 no complexo Ciclina D1/RAD51/BRCA2, é independente da ativação das CDK4/CDK6.

### **Metabolismo mitocondrial**

A deficiência de Ciclina D1 está associada com o aumento do tamanho e atividade mitocondrial (SAKAMAKI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006). O fenótipo mitocondrial requer a função dependente de CDK da Ciclina D1, que reprime o indutor da expressão de genes mitocondriais, NRF-1, através de sua fosforilação (WANG *et al.*, 2006). Este papel, como um inibidor da biogênese e atividade mitocondrial foi confirmado *in vivo*. Consistente com esses achados, tumores mamários induzidos por Ciclina D1 mostraram inibição da atividade

mitocôndrial e glicólise aeróbica com aumento de glicólises citosólicas (SAKAMAKI *et al.*, 2006).

De acordo com Pestell (2013), a inativação da superexpressão de pRb ou p21<sup>Cip1</sup> também inibe o metabolismo mitocôndrial, aumentando a glicólise citosólica. Isso sugere que o efeito da Ciclina D1 é parte de um papel mais amplo do complexo Ciclina D1/CDK/Rb.

### **Diferenciação celular de adipócitos e metabolismo da gordura**

A Ciclina D1 inibe a atividade de PPAR $\gamma$ , o qual tem crucial papel no metabolismo de ácidos graxos, homeostase energética e adipogênese (LAMB *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003a; FU *et al.*, 2005; MUSGROVE *et al.*, 2011).

### **Instabilidade cromossômica (CIN)**

De acordo com Casimiro e colaboradores (2013), CIN é descrito como uma persistente perda/ganho de cromossomos ou aberrações estruturais como as translocações, deleções e inserções, resultando em um cariótipo anormal (LENGAUER, KINZLER & VOGELSTEIN, 1998; MALUMBRES & BARBACID, 2009; TOMPSON, BAKHOUM & COMPTON, 2010). A Ciclina D1 pode promover a tumorigênese por dirigir a CIN. A superexpressão desta proteína induz a amplificação do centrossômo, anormalidades no fuso mitótico como fusos multipolares e, aneuploidias (NELSEN *et al.*, 2005). CIN é uma consequência direta da indução de expressão do programa transcricional mitótico regulado pela Ciclina D1 (CASIMIRO *et al.*, 2013).

Os mecanismos moleculares que induzem CIN em tumores não são bem compreendidos (GOLLIN *et al.*, 2005).

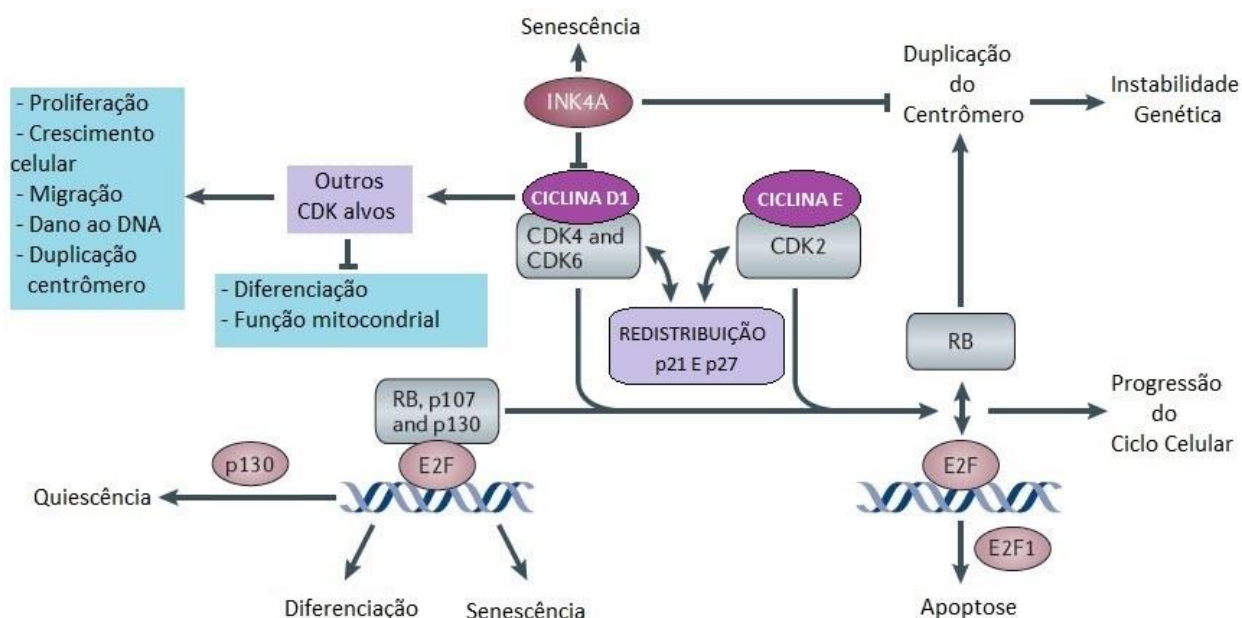
### **Expressão do genoma não-codificante**

Segundo Pestell (2013), pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares pelo qual as ciclinas e o ciclo celular regulam o genoma não-codificante. Os miRNAs regulam o fenótipo celular via regulação na eficiência da tradução ou estabilidade dos mRNAs alvos. Yu e colaboradores (2008) relacionaram o miR-17/20 como um miRNA que reprime a expressão de Ciclina D1. No entanto, este estudo foi o primeiro a demonstrar uma regulação, dependente de ciclina, de RNAs não-codificantes, via ligação da ciclina na

região regulatória do *cluster* do miRNA não-codificante. Yu e colaboradores (2010), sugerem que o complexo regulatório *loops* entre o genoma codificante e não-codificante governa a migração das células de câncer de mama.

Não está claro o mecanismo pelo qual o ciclo celular coordena a sinalização da biogênese de RNAs não-codificantes. Dada a perturbação dos precursores do genoma não-codificante em muitos tumores, isto será particularmente interessante para determinar o potencial papel das ciclinas nos aspectos mais amplos da regulação da biogênese do RNA não-codificante (PESTELL, 2013).

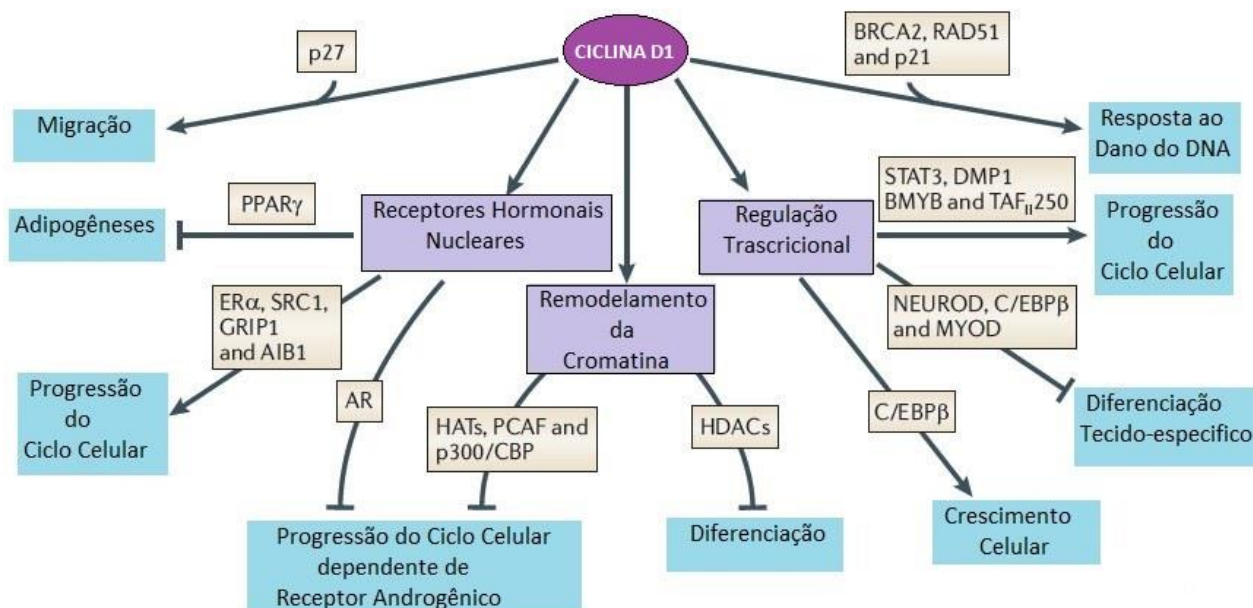
A figura 10 ilustra num esquema, as funções que dependem da atividade catalítica das CDKs.



**FIGURA 10. Funções, dependentes de CDK, da Ciclina D1.** Esquema com as principais funções dependentes de cinase que são desempenhadas pela proteína Ciclina D1 associada a CDKs.

**FONTE:** Musgrove *et al.*, 2011 (modificado).

A figura 11, ilustra num esquema, as funções independentes de CDK, desempenhadas pela Ciclina D1.



**FIGURA 11. Funções, independentes de CDK, da Ciclina D1.** Esquema com as principais funções independentes de cinase que são desempenhadas pela proteína Ciclina D1.

**FONTE:** Musgrove *et al.*, 2011 (modificado).

A compreensão do mecanismo pelo qual a Ciclina D1 reúne as informações do ambiente metabólico para regular a formação de células de gordura e o metabolismo *in vivo*, pode esclarecer o papel deste metabolismo no câncer (FU *et al.*, 2004). No entanto, o mecanismo pelo qual cada uma dessas funções contribui para a oncogênese permanecem incompreendidas (PESTELL, 2013).

Dado ao fato de que a Ciclina D1, orientada por mitógenos, desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular, metabolismo e diversas funções celulares, não é surpresa que esteja frequentemente desregulada nas malignidades humanas.

#### 2.5.4 Ciclina D1 como um oncogene

Mais de 100 proteínas que interagem com a Ciclina D1 em células de câncer humano têm sido identificadas (JIRAWATNOTAI *et al.*, 2011). Decorrente das diversas funções que são desempenhadas pela Ciclina D1, a desregulação desta proteína não apenas promove uma proliferação independente de fatores mitógenos, mas também um comprometimento em diversos outros processos celulares, de forma direta e indireta, que terá consequências potencialmente oncogênicas. Coletivamente, esses dados

reforçam a importância das funções moleculares da Ciclina D1 na oncogênese (MUSGROVE *et al.*, 2011).

De acordo com Arnold e Papanikolaou (2005), por definição, um gene cuja amplificação contribui para uma vantagem tumorigênica seletiva, é um oncogene. *CCND1* é um oncogene humano bem estabelecido: um recente censo concluiu que há uma quantidade substancial de evidências para o envolvimento da amplificação e superexpressão do gene *CCND1* no câncer de mama e significantes evidências para o seu envolvimento nos cânceres de pulmão, melanoma e carcinoma de células orais escamosas (SANTARIUS *et al.*, 2010).

Alterações genéticas nos circuitos regulatórios que governam a transição da fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, ocorrem frequentemente nos cânceres humanos, sendo a superexpressão da Ciclina D1, uma das alterações mais comumente observadas (DIEHL, 2002). Segundo Kim e Diehl (2009), análises moleculares de tumores humanos têm revelado que a superexpressão da Ciclina D1 prevalece sobre as de Ciclina D2 e D3. A Ciclina D1 apresenta-se amplificada e/ou superexpressa em uma proporção substancial de diferentes tumores, sendo que este aumento ocorre precocemente durante a tumorigênese (WEINSTEIN, 1996). Embora as mutações tenham sido implicadas nesta aberrante expressão da Ciclina D1, a superexpressão desta proteína é muito mais comum do que pode ser explicado pelas amplificações (número de cópias) ou eventos mutacionais que afetem o gene *CCND1*. Sendo assim, múltiplos mecanismos dirigem esta superexpressão em tumores humanos. Os principais mecanismos de desregulação no câncer vão além das alterações genômicas, como os rearranjos cromossômicos (translocações), amplificações gênicas, mutações e polimorfismos, incluindo a regulação pós-transcricional por microRNAs, mecanismos pós-traducionais, como a perturbação da exportação nuclear e proteólise (KIM & DIEHL, 2009) e as vias de sinalização com ativação oncogênica (MUSGROVE *et al.*, 2011).

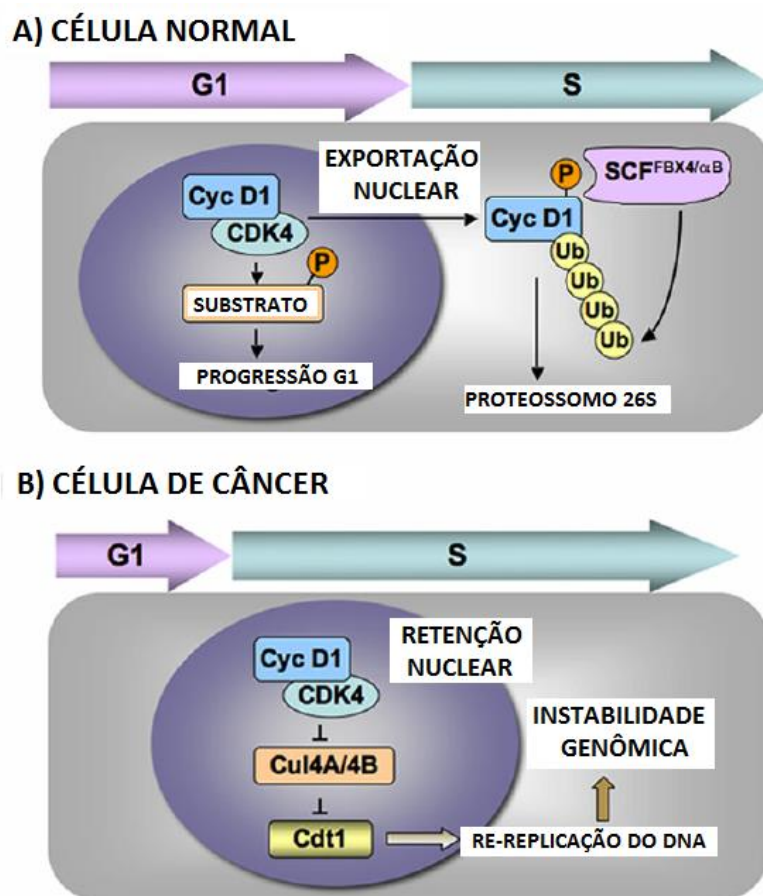
Muitas vias de sinalização intermediada, incluindo as vias Ras-MEK-ERK e PI3K regulam a expressão da Ciclina D1 (Figura 8). A superexpressão da Ciclina D1 através dessas vias podem ter consequências oncogênicas em adição a desregulação da sinalização mitogênica, como a amplificação do

centrossômo, induzido por Ras, que é dependente da CDK4 (ZENG *et al.*, 2010).

Uma alternativa emergente de mecanismo para a superexpressão da Ciclina D1 é a perda de miRNAs que tem como alvo *CCND1*. Entre eles estão o miR-15a e miR-16. Suas expressões são inversamente correlatadas com a expressão da Ciclina D1 em cânceres de próstata e pulmão (BONCI *et al.*, 2008; BAND *et al.*, 2009). No entanto, não está claro como a deleção de um importante miRNA pode ser uma causa de superexpressão da Ciclina D1 (MUSGROVE *et al.*, 2011).

No câncer, a desregulação da degradação da Ciclina D1 também está associada ao aumento da oferta desta proteína no núcleo celular. Os níveis de Ciclina D1 começam a subir no início de G<sub>1</sub>, e continuam altos até a transição das fases G<sub>1</sub>/S, quando caem rapidamente (ALAO, 2007). Segundo Kim e Diehl (2009), em células normais, após a progressão de G<sub>1</sub>, a Ciclina D1 é exportada do núcleo através de um mecanismo que envolve a fosforilação do resíduo T286 e Crm1, mediada por GSK3 $\beta$ . Uma vez no citoplasma, a Ciclina D1 fosforilada é reconhecida e ubiquitinizada pela ligase SCF<sup>Fbx4/ $\alpha$ B-crystallin</sup>, marcando-a para a degradação pelo proteassoma 26S. Em células cancerosas, o acúmulo constitutivo no núcleo de complexos ativos Ciclina D1/CDK4, pode ser obtido através de vários mecanismos: 1) mutações na Ciclina D1 que impedem o reconhecimento por Crm1 (BENZENO *et al.*, 2006; MORENO-BUENO *et al.*, 2003); 2) mutação de Fbx4 que bloqueia a degradação dependente de ubiquitina (BARBASH *et al.*, 2008); e 3) processamento alternativo do transcrito de Ciclina D1, o qual remove sequências que promovem a exportação nuclear direta e destruição dependente de Fbx4 (LU, GLADDEN & DIEHL, 2003). Em condições normais, a degradação da Ciclina D1 tem sido descrita como essencial para a ocorrência da replicação do DNA (ALAO, 2007). No entanto, em situação patológica, este acúmulo da atividade nuclear do complexo Ciclina D1/CDK4 durante a fase S, estabiliza Cdt1 pela inibição transcricional de Cul4A e Cul4B, promovendo a re-replicação do DNA durante a fase S e induzindo, conseqüentemente, à instabilidade genômica (AGGARWAL *et al.*, 2007). A Figura 12 ilustra a degradação de Ciclina D1 em uma célula normal e a desregulação deste processo em uma célula de câncer.

De acordo com Aloa (2007), a degradação da Ciclina D1 pode ocorrer também, de forma independente de GSK3 $\beta$ .



**FIGURA 12. Regulação da degradação da Ciclina D1 em célula normal versus célula de câncer.** A) Em células normais a Ciclina D1 é degradada, após a progressão de G<sub>1</sub> para fase S, no citoplasma, após marcação com ubiquitina. B) Em células cancerosas, esta regulação é perdida por uma série de mecanismos, que levam ao aumento da atividade do complexo Ciclina D1/CDK4 no núcleo durante a fase S, promovendo instabilidade genômica.

**FONTE:** Kim e Diehl, 2009 (modificado).

O produto proteico resultante do processamento alternativo no processamento de *CCND1* (Ciclina D1b) é completamente diferente quanto ao domínio C-terminal da proteína Ciclina D1a (Figura 6). Este domínio C-terminal divergente possui defeitos em vários motivos que tipicamente regulam a degradação da Ciclina D1, incluindo o motivo PEST e o resíduo T286 que controlam a exportação nuclear e a estabilidade da proteína. Segundo Lu, Gladden e Diehl (2003) e Solomon e colaboradores (2003), a proteína codificada no processamento alternativo para Ciclina (D1b) é uma isoforma oncogênica da Ciclina D1. Esta isoforma de Ciclina D1 é refratária à exportação nuclear dependente de Crm1 e GSK3 $\beta$ , sendo constitutivamente nuclear. De

acordo com Alt e colaboradores (2000), quando a Ciclina D1 é constitutivamente localizada no núcleo, promove a transformação oncogênica. Interessantemente, foi demonstrado que o acúmulo de Ciclina D1b aumenta a capacidade de transformação, quando comparada à Ciclina D1a (LU, GLADDEN & DIEHL, 2003; SOLOMON *et al.*, 2003). Solomon e colaboradores (2003), também demonstraram que Ciclina D1b tem baixo potencial como ativador de CDK4 para a fosforilação de pRB. Segundo Quelle e colaboradores (1993) e Alt e colaboradores (2000), paradoxalmente, embora a superexpressão da Ciclina D1 ocorra com alta frequência em uma variedade de cânceres, essa superexpressão sozinha não é suficiente para induzir a transformação maligna. Em contraste, a superexpressão da Ciclina D1 mutante Ciclina D1-T/A286, que não pode ser fosforilada por GSK3 $\beta$ , sendo estabilizada no núcleo ao longo da interfase, transforma fibroblastos murinos na ausência da colaboração de um outro oncogene (ALT *et al.*, 2000). Logo, a desregulação da exportação nuclear da Ciclina D1 resulta num aumento da capacidade oncogênica desta proteína.

Segundo Knudsen e colaboradores (2006), o número de cânceres humanos que podem ser influenciados pela atividade da Ciclina D1b tem sido identificado amplamente através da associação com o polimorfismo G/A870. O polimorfismo G/A na posição do nucleotídeo 870 impede a ocorrência do processamento normal no limite dos exons 4/5, resultando numa proteína truncada, Ciclina D1b (BETTICHER *et al.*, 1995). Embora, esta proteína variante, possa formar um complexo ativo com a CDK4 (LU, GLADDEN & DIEHL, 2003; SOLOMON *et al.*, 2003), não tem o resíduo T286 no domínio C-terminal, necessário para a exportação nuclear e subsequente degradação citoplasmática (DIEHL, ZINDY & SHERR, 1997). Esta diferença estrutural do transcrito D1b aumenta o seu potencial oncogênico (ALT *et al.*, 2000; LU, GLADDEN & DIEHL, 2003).

Mais de 100 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram identificados no *locus* da Ciclina D1, no entanto o polimorfismo G/A870 é o mais estudado (KNUDSEN *et al.*, 2006). Devido ao significado da Ciclina D1 nos cânceres humanos, um grande número de estudos epidemiológicos tem buscado a influência deste polimorfismo na susceptibilidade ao câncer e evolução da doença. Estudos têm mostrado genótipos específicos associados



ao risco aumentado para desenvolver câncer ou a um prognóstico ruim para vários tipos de tumor. De fato, o alelo A foi frequentemente associado ao risco aumentado para o câncer e má evolução da doença, especialmente quando em homozigose no genótipo A/A. A ausência da sequência PEST ou resíduo T286, no domínio C-terminal, sugere que a regulação de ciclina D1b é substancialmente diferente da Ciclina D1a. No entanto, ambas as isoformas podem ser reguladas por degradação independente de fosforilação, através de outras vias de degradação (GERMAIN *et al.*, 2000; NEWMAN *et al.*, 2004; FRENG *et al.*, 2007), diferentes da anteriormente apresentada.

Neumeister e colaboradores descreveram, em 2003, a importância que a Ciclina D1 tem sobre a adesão celular, motilidade e direcionamento da migração de macrófagos primários da medula óssea. Portanto, na regulação da dinâmica da adesão celular, esta proteína pode contribuir para o crescimento celular e o fenótipo invasivo/metastático, através da regulação de interações com o substrato celular, independente de seus efeitos na progressão do ciclo celular.

Em vários tipos de câncer incluindo mama, pulmão, sarcomas e câncer de cólon, a superexpressão da Ciclina D1 é devida à indução por sinais oncogênicos, em vez de mutação somática clonal ou rearranjos no gene *CCND1* (HOSOKAWA & ARNOLD, 1998). Translocações cromossômicas envolvendo o gene *CCND1* são raras em tumores sólidos, estando presentes com maior frequência em linfomas e leucemias (BOSCH *et al.*, 1994). Esta superexpressão está relacionada com a importância da Ciclina D1 no direcionamento dos processos neoplásicos em diversos tipos de câncer: linfoma de células do manto (MCL) (JARES *et al.*, 2007; VOSE, 2013), câncer de pulmão de células não-pequenas (BETTICHER *et al.*, 1996; JIN *et al.*, 2001) e, carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (BARTKOVA *et al.*, 1995; MASUDA *et al.*, 2002), esôfago (SHAMMA *et al.*, 2000) e mama (BARNES & GILLET, 1998; LAMB *et al.*, 2003).

### **2.5.5 Papel da Ciclina D1 no câncer de mama**

A amplificação e superexpressão da Ciclina D1 têm sido relatadas por vários autores em carcinomas primários da mama (BUCKLEY *et al.*, 1993; BARTKOVA *et al.*, 1994; GILLET *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994; BIÈCHE *et*

*al.* 2002; LAMB *et al.*, 2003), e têm sido mostradas causando câncer de mama em camundongos transgênicos (WANG *et al.*, 1994). Vários autores, desde a década de 90, têm descrito que em torno de 15% dos tumores de mama apresentam amplificações gênicas de *CCND1*, enquanto a superexpressão da proteína Ciclina D1 tem-se mostrado mais frequente, ocorrendo entre 30 a 50% dos tumores primários de mama (ALI *et al.*, 1989; BORG *et al.*, 1991; HENRY *et al.*, 1993; GILLETT *et al.*, 1994; DICKSON *et al.*, 1995; McINTOSH *et al.*, 1995; GILLETT *et al.*, 1996; BARBARESCHI *et al.*, 1997; JARES *et al.*, 1997; NIELSEN *et al.*, 1997; KENNY *et al.*, 1999; BIÈCHE *et al.*, 2002).

O significado biológico da função regulatória, independente de cinase, da Ciclina D1, foi solidificada a partir da análise de genes desregulados em carcinomas mamários. Lamb *et al.* (2003) revelaram que a superexpressão de Ciclina D1 não impede a função de pRB no câncer de mama, e que as mudanças celulares associadas à superexpressão da Ciclina D1 não foram atribuídas às alterações no ciclo celular. A principal ação da Ciclina D1 neste tecido parece ser a modulação direta de C/EBP $\beta$ , evidenciando que a habilidade da Ciclina D1 para regular a transcrição pode influenciar fortemente suas funções no câncer. Acredita-se, que a atuação inibitória de Ciclina D1 sobre o fator de transcrição C/EBP $\beta$  tenha um importante papel na programação da diferenciação de vários tipos de células. De fato, o padrão de expressão de genes em vários tumores mamários oferece clara indicação de que as interações da Ciclina D1 com C/EBP $\beta$  contribuem significativamente para o perfil transcricional destas células (PESTELL, 2013). De acordo com Knudsen e colaboradores (2006), esta função da Ciclina D1 corresponde a um papel, independente de sua função no ciclo celular, com importantes implicações na biologia tumoral. Além do fator transcricional C/EBP $\beta$  (LAMB *et al.*, 2003), a maior classe de fatores transcricionais regulada pela Ciclina D1 é a superfamília de receptores nucleares. Vários membros da superfamília dos receptores de hormônio esteróide e seus co-reguladores interagem com a Ciclina D1 (COQUERET, 2002; FU *et al.*, 2004), incluindo o ER (LAMB *et al.*, 2000) e AR (KNUDSEN *et al.*, 1999). A Ciclina D1 pode aumentar a ativação da transcrição, através do recrutamento de coativadores, ou induzir à repressão, através de sua associação com HDACs (KNUDSEN *et al.*, 2006).

A Ciclina D1 é um regulador positivo da transcrição mediada por ER, aumentando a atividade de ER e desencadeando a ativação de ER através do recrutamento de P/CAF (ZWIJSEN *et al.*, 1997; McMAHON *et al.*, 1999). Ao se associarem ao ER, as Ciclinas D1 mimetizam a ligação com seu ligante, o estrogênio, estimulando suas atividades transcricionais. Mais de 70% dos cânceres de mama expressam ER, desencadeando os efeitos mitogênicos do estrogênio. Como a Ciclina D1 está superexpressa na maioria desses tumores e pode ativar este receptor, os complexos Ciclina D1-ER também podem levar à proliferação celular (WEINBERG, 2008). Em contraste com a sua ativação da sinalização de ER, a Ciclina D1 inibe a atividade de AR em vários tipos de tumores, incluindo o câncer de mama. A ciclina D1 forma um complexo específico com o AR, através de sua porção C-terminal. O mecanismo através do qual a Ciclina D1 inibe AR parece ser, em parte, dependente de HDACs (PETRE-DRAVIAN *et al.*, 2003).

Robles e colaboradores (1998), sugerem um papel da Ciclina D1 na tumorigênese induzida por Ras enquanto Lee e colaboradores (2000), apontam que esta proteína é crítica para cânceres de mama induzidos pelos oncogenes *Ras* e *HER2*.

Como descrito, são várias as evidências sobre a relevância da Ciclina D1 no câncer de mama. No entanto, o valor prognóstico de sua superexpressão no câncer de mama ainda é controverso. Recentes estudos têm sugerido um valor preditivo favorável para a Ciclina D1 em carcinomas primários de mama (EL-HAFEZ, SHAWKY & HASAN, 2013; MYLONA *et al.*, 2013).

## **2.6 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)**

Como as células tumorais expressam marcadores característicos, que podem ser detectados através da amplificação de mRNAs gene-específicos (NEUMAIER, GERHARD & WAGENER, 1995), vários trabalhos visando detectar e quantificar alguns destes marcadores têm sido realizados com o objetivo de aprimorar os métodos diagnósticos utilizados atualmente. De acordo com Heid *et al.* (1996) e Lockey, Otto e Long (1998), a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) representa a mais poderosa tecnologia para detectar e amplificar vestígios de mRNA.

O método da PCR em tempo real (qPCR) foi desenvolvido por Heid e colaboradores (1996) e possibilita a quantificação de DNA, RNA ou cDNA molde inicial da reação. Desde a sua criação, a tem sido amplamente utilizada permitindo rápida, precisa e sensível quantificação de mRNA, com um alto rendimento de amostras (SCHEFE *et al.*, 2006). Este método baseia-se na cinética da reação de PCR, na atividade nuclease 5' da enzima DNA polimerase e na detecção de fluorescência (HEID *et al.*, 1996; WITTWER *et al.*, 1997). Segundo Schmittgen e Livak (2008), é devido às propriedades da PCR que se tem sua aplicação na análise da expressão gênica, uma vez que a quantidade detectada em determinado ponto da reação é diretamente proporcional à quantidade inicial do alvo na amostra.

Agentes fluorescentes são necessários para monitorar a cinética da reação, sendo as sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos específicos (como a sonda *TaqMan*<sup>®</sup>; GIBSON, HEID & WILLIAMS, 1996; HEID *et al.*, 1996) ou agentes intercalantes do DNA (como o corante *SYBR*<sup>®</sup> *Green I*, um intercalante de DNA fita-dupla não-específico; SCHMITTGEN *et al.*, 2000; YIN *et al.*, 2001), os mais utilizados. É a detecção da fluorescência, emitida por estes agentes, que torna possível quantificar o RNA molde inicial utilizado na reação, considerando que a quantidade de fluoróforo incorporado é proporcional à quantidade de alvo gerado (WITTWER *et al.*, 1997). A detecção desses sinais fluorescentes se dá por equipamentos específicos de qPCR (termocicladores com sistema óptico desenvolvido para detecção de fluorescência) acoplados a um sistema computacional. O *software* converte os dados de fluorescência gerados, em uma análise em tempo real da reação.

A quantificação pelo método de (análise *Real Time*) é obtida a partir dos dados da fase exponencial da reação (SCHEFE *et al.*, 2006), diferente da análise qualitativa da PCR convencional que tem seus resultados baseados na presença ou ausência do alvo na fase platô da reação, quando a maior parte dos reagentes já foram consumidos. Uma análise qualitativa *End Point*, também denominada “ensaio de leitura de placa”, que mede a quantidade de produto da PCR acumulado ao final dos ciclos da reação, pode ser realizada em equipamento com detecção de fluorescência, dispensando a visualização dos resultados em gel de agarose.

Durante a fase exponencial da PCR, para uma reação otimizada com 100% de eficiência, assume-se que a quantidade de produto duplica a cada ciclo (HEID *et al.*, 1996). Este princípio cinético é fundamental para a análise por qPCR, uma vez que os dados utilizados na quantificação só poderão ser considerados para reações com aproximadamente 100% de eficiência, onde esta cinética está, de fato, acontecendo (TICHOPAD *et al.*, 2003).

A análise dos dados é feita através dos valores de Ct, que representam o ciclo em que cada curva de amplificação cruza um limite de fluorescência basal, denominado *threshold* (SCHEFE *et al.*, 2006). Anteriormente ao *threshold* há uma pequena emissão de fluorescência, correspondente aos ciclos iniciais da PCR (*baseline*).

Para normalizar os dados da qPCR quanto a variáveis incontroláveis, como variações na quantidade de substrato (*template*) inicial disponibilizado para reação, amplifica-se controles endógenos (*housekeeping*), que são genes de expressão constitutiva e estável, independente do grupo amostral. Estes controles internos, tecnicamente, normalizam as variantes decorrentes de erros experimentais garantindo, com isso, que a variação na expressão gênica observada entre os grupos amostrais de interesse, seja devida a condições biológicas e não a erros experimentais (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Atendendo a objetivos diferentes, duas formas de quantificação têm sido empregadas na análise por qPCR: quantificação absoluta, cuja abordagem relaciona o número de cópias, usando uma curva de calibração (BUSTIN, 2000; PFAFFT & HAGELEIT, 2001), e quantificação relativa, que mede a mudança relativa nos níveis de expressão de mRNA (PFAFFL, 2004). Na quantificação relativa, os valores de Cts são comparados para cada amostra, e os resultados representam ordens de grandeza. Há dois métodos para se analisar a expressão gênica através de uma quantificação relativa, o Método da Curva Padrão Relativa (MORRISON, WEIS & WITWER, 1998) e o Método do Ct comparativo, também denominado Método do  $\Delta\Delta Ct$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Descrito por Livak e Schmittgen (2001), no Método do Ct comparativo, a expressão relativa do gene alvo em uma amostra é obtida pela comparação com a expressão do mesmo gene em uma amostra referência, denominada calibrador. Esta expressão relativa (RQ) do gene na amostra em relação ao calibrador, é obtida através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK &

SCHMITTGEN, 2001; XIA *et al.*, 2010), e denominado *Fold Change* (FC). Este método dispensa a curva padrão como parte do experimento. No entanto, a validação inicial dos experimentos requer a montagem da curva padrão a fim de otimizar a reação até atingir máximas eficiências de reação que sejam iguais para os ensaios de genes alvos e controles endógenos. O fato deste método dispensar curva padrão como parte do experimento confere grande vantagem técnica, especialmente para análises com grande número de genes alvos ou amostras.

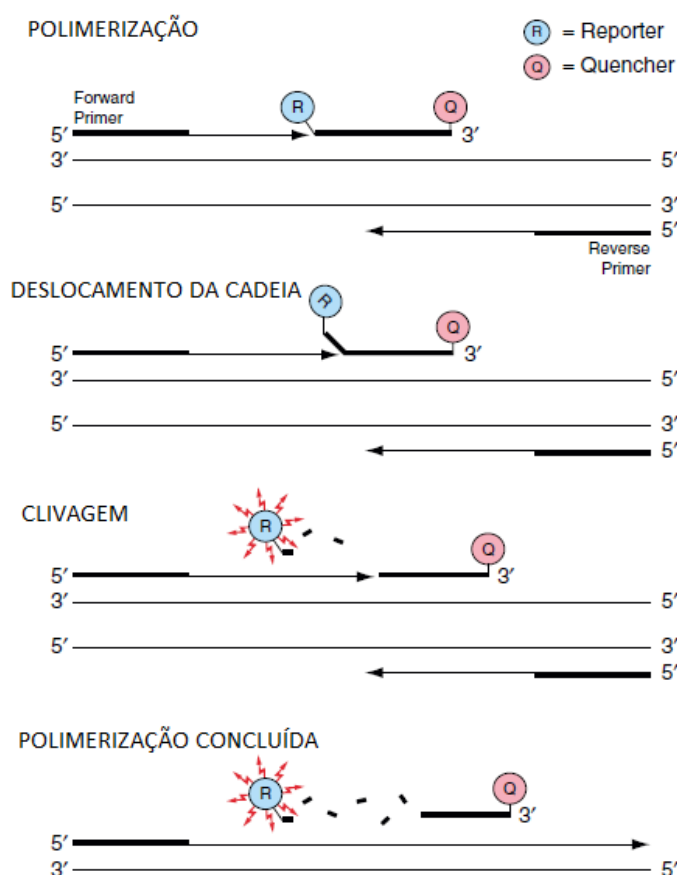
Como a qPCR tem alta sensibilidade e especificidade e boa reprodutibilidade (FREEMAN, LEE & RICHARDSON, 1999; BUSTIN, 2000; SCHMITTGEN *et al.*, 2000), sendo considerado o método mais sensível e confiável por vários autores, em particular, para tecidos com pouca abundância de transcritos, baixas concentrações de RNA, RNA parcialmente degradado e para amostras de tecido limitado (FREEMAN, LEE & RICHARDSON, 1999; STEUERWALD *et al.*, 1999; MACKAY, ARDEN & NITSCHKE, 2002), diversos trabalhos têm realizados análise por qPCR para elucidar aspectos desconhecidos sobre o câncer de mama (BIÈCHE, 2002; BOSTNER *et al.*, 2007; WIESTNER *et al.*, 2007; TOBIN *et al.*, 2011).

### **2.6.1 Sistema de detecção: Sonda fluorescente *TaqMan*<sup>®</sup>**

Entre os sistemas de detecção específica de sequências, disponíveis no mercado para a análise da qPCR, têm-se as sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos, que podem ser adquiridas como ensaio comercial *TaqMan*<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Estas sondas são altamente sensíveis, seu sistema de detecção elaborado requer uma hibridização específica entre a sonda e o alvo para emitir sinal fluorescente.

Segundo Ginzinger (2002), a sonda consiste de um oligonucleotídeo de fita simples que é complementar a uma das fitas da sequência amplificada pelo par de *primers*. Contém um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. O corante *reporter*, tal como o corante *FAM*<sup>™</sup>, é covalentemente ligado à extremidade 3' do oligonucleotídeo. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* resulta na supressão da fluorescência emitida pelo corante *reporter*, principalmente por transferência de energia do tipo Förster (FÖRSTER, 1948).

Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se acopla logo após um dos *primers* e é clivada pela atividade nuclease 5' da DNA polimerase, enquanto o *primer* é estendido. A clivagem da sonda separa o corante *reporter* do *quencher*, liberando o sinal do corante *reporter* e promovendo, assim, a emissão da fluorescência. Esta clivagem, garante a remoção da sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde. Deste modo, a inclusão da sonda não inibe o processo geral da PCR (Figura 13). O acúmulo exponencial de produto da PCR é detectado diretamente pelo monitoramento do aumento da fluorescência do corante *reporter*.



**FIGURA 13. Esquema de funcionamento da sonda *TaqMan*<sup>®</sup>.** O funcionamento desta sonda depende da atividade 5' nucleolítica da AmpliTaq<sup>®</sup>Gold DNA polimerase.  
**FONTE:** Protocolo *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix*-Applied Biosystems (modificado).

Atualmente, dois tipos de sondas fluorescentes *TaqMan*<sup>®</sup> são oferecidas pela Applied Biosystems, sendo a *TaqMan*<sup>®</sup>MGB a mais indicada devido à presença de um *quencher* não-fluorescente (QNF) na extremidade 3', que permite aos instrumentos de qPCR medir as contribuições do corante *reporter*

mais precisamente, pois o *quencher* não fluoresce. Também na extremidade 3' das sondas *TaqMan*<sup>®</sup>MGB há um *minor groove binder* que aumenta a temperatura de *melting* (*T<sub>m</sub>*) das sondas, permitindo assim, o uso de sondas menores (KUTYAVIN *et al.*, 2000).

A utilização de sondas *TaqMan*<sup>®</sup> em experimentos de qPCR garante maior confiabilidade aos dados fornecidos, devido à alta especificidade da sonda que não produz sinal fluorescente de produtos inespecíficos. Uma outra vantagem das sondas *TaqMan*<sup>®</sup> sobre corantes de ligação inespecífica ao DNA dupla-fita, como o *SYBR*<sup>®</sup>*Green I*, é a uniformidade na sensibilidade para alvos de diferentes tamanhos. Em corantes de ligação inespecífica, múltiplos corantes podem se ligar a uma única molécula amplificada, o que aumenta a sensibilidade de detecção para os produtos de amplificação. Deste modo a ligação de múltiplos corantes em uma única molécula fará com que a quantidade de sinal emitido seja dependente da massa de DNA dupla-fita produzido na reação. Assim, se as eficiências de amplificação são as mesmas, a amplificação de um produto mais longo irá gerar mais sinal do que um mais curto. No caso de sondas de hidrólise fluorescente, um único fluoróforo é liberado da supressão pelo *quencher*, para cada molécula amplificada sintetizada, independentemente do seu comprimento. A escolha de sondas fluorescentes *TaqMan*<sup>®</sup> também possibilita ensaios *multiplex*, com mais de um conjunto *primers* e sondas, permitindo ensaios de alvos e controles endógenos numa mesma reação. Além disso, como não há amplificações inespecíficas, dispensa-se a análise da curva de dissociação dos produtos de amplificação que é realizada no final da reação de PCR e baseia-se nas diferentes temperaturas de dissociação dos produtos amplificados, dependendo do seu tamanho e conteúdo. Esta característica da temperatura de dissociação dos produtos amplificados é denominada temperatura de *melting*, *T<sub>m</sub>* (Manual de treinamento, Applied Biosystems).

Sendo produtos comerciais, o uso de sondas fluorescentes *TaqMan*<sup>®</sup> dispensa testes de otimização com curva padrão, para validação inicial dos experimentos, pois todos os testes já foram realizados e garantem 100% de eficiência para reações contendo conjuntos de sondas fluorescentes e par de *primers* *TaqMan*<sup>®</sup> *Assays on-demand* e seu respectivo *TaqMan*<sup>®</sup> *Master Mix*



comercial, que é escolhido pelo pesquisador de acordo com o tipo de corrida e reação que deseja realizar.

### 3. JUSTIFICATIVA

Embora o grande número de pesquisas realizadas nos últimos anos tenha resultado em avanços no diagnóstico, terapia e prognóstico, o câncer de mama permanece como uma das principais doenças letais em mulheres. A progressão tumoral, com a invasão adjacente e posteriormente o desenvolvimento de metástases à distância, é a responsável pela alta taxa de mortalidade observada nestas pacientes.

Diante disso, estudos que objetivam a identificação das alterações moleculares que ocorrem em tumores primários e em suas correspondentes metástases mamárias têm sido realizados há mais de 20 anos no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, com a colaboração da *Georgetown University*, Washington, DC, USA. Dados recentemente relatados por este grupo, quanto à investigação das alterações no DNA, através do método de *CGH-array*, em amostras de tumores primários de mama e metástases axilares, demonstraram que 90% das alterações mais frequentes foram comuns aos dois grupos (TORRESAN, 2011). Diferentes *softwares* como *Nexus-Biodiscovery*, *Script* entre outros, foram utilizados para identificar os principais genes mapeados em regiões que apresentaram ampliações gênicas em tumores primários e metástases axilares. Dentre os genes selecionados, o *CCND1* foi escolhido para este estudo, inclusive devido a todas as suas particularidades funcionais já descritas.

Outros genes devem ser analisados a partir das regiões cromossômicas apontadas no trabalho de Torresan (2011): 1q21.3-q22, 6p22.1, 8q24.3, 11q13.1, 17q25.3 e 20q13.33. Objetiva-se com esta análise, identificar genes que possam estar envolvidos no desenvolvimento e progressão das metástases axilares, justificando a amplificação gênica anteriormente relatada e, conseqüentemente, contribuir para a identificação de potenciais marcadores de progressão tumoral.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral:**

Analisar a expressão do gene *CCND1* em amostras de carcinomas primários de mama.

### **4.2 Objetivos específicos:**

**4.2.1** Analisar a expressão do gene *CCND1* ao nível de mRNA em amostras de carcinomas mamários, com e sem metástases, em linfonodos axilares.

**4.2.2** Analisar a expressão da proteína Ciclina D1 nos mesmos grupos amostrais.

**4.2.3** Analisar possíveis associações entre os resultados observados e os parâmetros clínico-patológicos das pacientes, incluindo dados do acompanhamento clínico.

**5. CAPÍTULO I**  
**ARTIGO**

**No difference in *CCND1* gene expression between patients with and without lymph node metastasis**

Maia, L. B. L., M.Sc.<sup>a</sup>; Breginski, F. S. C., Ph.D.<sup>b</sup>; Cavalcanti, T. C. S., M.Sc.<sup>b</sup>; Souza, R. L. R. de, Ph.D.<sup>a</sup>; Roxo, V. M. S., Ph.D.<sup>a</sup>; Ribeiro, E. M. S. F., Ph.D.<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, 81531-970, Brasil.

<sup>b</sup>Citolab- Laboratório de Citopatologia e Histopatologia, Batel, Curitiba, PR, 80420-011, Brasil.

Submissão à revista *Clinical and Experimental Medicine*.

Autor para correspondência: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Ph.D.  
Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, 81531-970, Brasil. Fax: +55 (41) 3361-1793, endereço de e-mail: [eribeiro@ufpr.br](mailto:eribeiro@ufpr.br)

## No difference in *CCND1* gene expression between patients with and without lymph node metastasis

L. B. L. Maia; F. S. C. Breginski;  
T. C. S. Cavalcanti; R. L. R. de Souza;  
V. M. S. Roxo; E. M. S. F. Ribeiro.

### ABSTRACT

The Cyclin D1 protein has been extensively studied over the last decades, for their various roles in the physiological processes in both normal and cancer cells. Gene amplifications and overexpression of *CCND1* are frequently reported in several types of cancers, including breast carcinomas, showing the increasing relevance of Cyclin D1 in tumorigenesis. Little is known about the role of this protein in the metastatic process and the main objective of this study was to evaluate the importance of the *CCND1* as a potential marker of tumor progression in breast carcinomas. We studied 41 samples of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections invasive ductal breast carcinomas subdivided into metastatic (n=19) and non-metastatic (n=22) tumors. Gene expression analysis was performed through *Real Time* PCR and immunohistochemistry. In spite of the higher expression levels of *CCND1* mRNA and protein in tumors when compared to the control samples, no differences were observed between the metastatic and non-metastatic groups, suggesting that, in this sample, the expression of *CCND1* do not significantly influenced the metastatic process. Further studies must be performed in an attempt to clarify the diagnostic and prognostic value of Cyclin D1 in breast cancer, as well as the mechanisms that trigger their over expression in tumors.

**Keywords:** Breast cancer. Gene expression. *CCND1*. Metastasis.

E. M. S. F. Ribeiro (author for correspondence).  
Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brasil.  
e-mail: eribeiro@ufpr.br

L. B. L. Maia; E. M. S. F. Ribeiro; R. L. R. de Souza;  
V. M. S. Roxo.  
Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brasil.

F. S. C. Breginski; T. C. S. Cavalcanti.  
Citoblab- Laboratório de Citopatologia e Histopatologia, Batel, Curitiba, Paraná, Brasil.

### INTRODUCTION

Data from the Unique System of Health (SUS) demonstrated that breast cancer is the second most common cancer worldwide and the most frequent among women (<http://mortalidade.inca.gov.br>).

The *CCND1* gene encodes the Cyclin D1 protein. Its role in the regulation of cell cycle progression through the transition G1/S [1,2] is well established. Cyclin D1 performs other important functions independent of CDK [3-5]. Currently, new functions have been described for this protein, including the inhibition of mitochondrial metabolism through phosphorylation by NRF-1, control of the activity of transcription factors by recruitment chromatin remodeling proteins, repair control on DNA damage through the recruitment of repair complexes and regulation of non-coding genome [6,7].

According to Motokura and Arnold [8] the *CCND1* gene has been identified as an oncogene, presenting chromosomal rearrangements, gene amplification and overexpression in a variety of tumors. This overexpression in tumors is driven by multiple mechanisms including genomic alterations such as chromosomal translocations, gene amplification and polymorphism; post-transcriptional regulation of microRNAs and post-translational mechanisms such as disturbing nuclear export and proteolysis [9].

Amplification and over expression of Cyclin D1 have been reported by several authors in primary breast carcinomas [4, 10-14], and has been demonstrated causing breast cancer in transgenic mice [14]. Several studies have reported that around 15% of breast tumors have gene amplifications in *CCND1*, while protein over expression of Cyclin D1 has been more frequent, occurring between 30-50% of primary breast tumors [10, 13, 15-24].

Strong evidence imply relevance of Cyclin D1 in tumor process. However, the prognostic value of its over expression in breast cancer is still controversial. Thus, the main objective of this study was to evaluate the prognostic value of *CCND1* as a potential tumor progression marker in breast carcinomas.

### MATERIAL AND METHODS

This work has the approval of the Ethics Committee for Research on Human Subjects of the Nossa Senhora das Graças Hospital, Curitiba/PR, following all the rules of the Institutions involved.

#### Samples

It was analyzed 41 formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (FFPE) samples of invasive

ductal carcinoma, selected in the Citolab laboratory from the years 2009 to 2012. The samples were divided according to the status of the axillary lymph nodes, and 19 were lymph node-positive (LNP) and 22 lymph node-negative (LNN). The patients' average age was 51.7, ranging from 35 to 65 years. The clinical and pathological characteristics of the patients studied are presented in Table 2, in the results.

The normal control was composed by a pool of five samples of non-tumor breast tissue selected in the same laboratory.

### Quantitative Real Time PCR

**RNA extraction.** The total RNA was extracted using the commercial kit *High Pure RNA Paraffin Kit* (Roche) according to manufacturer's instructions. The quality of the RNA obtained was determined by spectrophotometer *Nanodrop®2000* (Thermo Fischer Scientific Inc.) e *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies).

**cDNA synthesis.** Reverse transcription RNA occurred in a final volume of 20µl, using the commercial kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche) according to manufacturer's instructions. The amount of 300ng RNA was used as starting template.

**PCR amplification.** All PCR reactions were performed on *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), using the fluorescent probe detection system *TaqMan® FAM™-MGB* and the *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The reaction final volume adopted was 10 µl with initial template amount of 30ng of cDNA. The ID *TaqMan® Gene Expression Assays (assay on demand)* (Applied Biosystems) (Table 1) were selected for amplification of the mRNA of both isoforms of Cyclin D1. Data was analyzed for relative quantification using the  $\Delta\Delta C_t$  method [25] with the *StepOne™ v2.3 software* (Applied Biosystems).

**TABLE 1. IDs of *TaqMan® Gene Expression Assays (assay on-demand)***

Name	Acronym	Assays ID	Amplicon size (em pb)	Exons-limit
Cyclin D1	CCN D1	Hs00765553_m1	57	3-4
β-actin	ACTB	Hs01060665_g1	63	2-3
β-2-microglobulin	B2M	Hs00984230_m1	81	3-4

Reference information of *TaqMan® assays* (Applied Biosystems): Acronym on database, ID *TaqMan®* commercial assays, amplicon size and limit between exons used to design the primers, forward and reverse, and *TaqMan® MGB* probe.

### Immunohistochemistry

The analysis of protein expression was performed using the anti-cyclin D1 monoclonal antibody. Twenty samples were used for this analysis, being 10 LNP and 10 LNN. Briefly, 3 to 4 µm tissue sections of FFPE were deparaffinized and rehydrated, submitted to antigen

retrieval, blockage of endogenous peroxidase activity and incubated with specific mAbs at 40°C overnight. After thorough washing in phosphate buffered saline (PBS) solution, sections were incubated for approximately 1 hour using the streptavidin-biotin (LSAB®, DAKO) system. Finally, sections were stained with 3,3'-Diaminobenzidine and faintly counterstained with hematoxylin. Two independent pathologists scored the slides based on the intensity of immunostaining.

### Statistical analysis

Data from qPCR assay were evaluated statistically by the *Shapiro-Wilk normality test*, showing a non-normal distribution. Thus, the non-parametric *Mann-Whitney test* was used to assess the significance of differences presented between the two sample groups of interest (LNP x LNN) as well as on changes in mRNA levels according to the clinicopathological parameters. The analysis was performed using *Prism 6 version 6.01* (GraphPad Software Inc.). The tests used a 5% significance level.

The  $\chi^2$  test (at 5% significance level) was used to assess the significance of differences between positive and negative results in protein expression.

## RESULTS

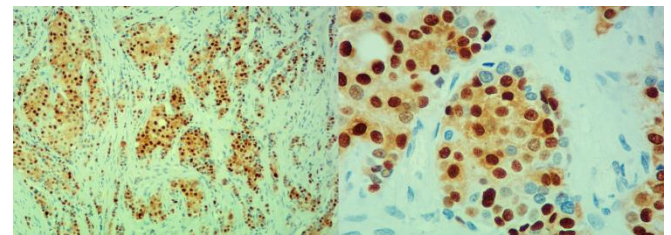
### Analysis of gene expression (mRNA):

In the relative quantification analysis of mRNA expression, the positive samples for metastasis in axillary lymph nodes (LNP) composed 46.2%, while the negative samples (LNN) represented 53.8% of the sample.

After the normalization with the reference genes (beta actin and beta-2-microglobulin) the Fold Change (FC) were obtained comparing the data with a calibrator (normal control) represented by a pool of non-tumor breast tissue samples. For the samples of LNP group, the gene expression corresponded to  $1.42 \pm 1.12$  times the calibrator expression, while on LNN group was  $1.46 \pm 1.37$ . These groups were compared and showed no significant difference ( $P = 0.601$ ) (Table 2).

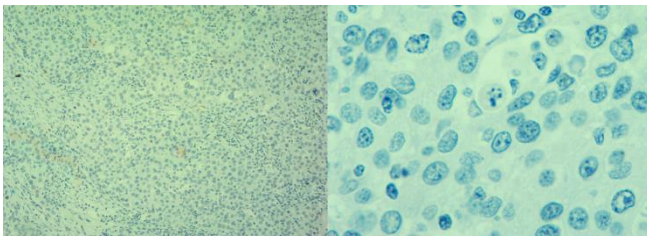
### Analysis of protein expression:

This analysis was performed in 20 samples selected according to the availability of paraffin blocks, 10 of the LNP group and 10 of the LNN. From the 20 samples, 18 (90%) were positive for Cyclin D1. The two negative samples were from the group LNN (10%). Figures 1 and 2 illustrate examples of positive-expression and negative-expression with the antibody used, respectively.



**FIGURE 1. Immunohistochemical study in ductal breast carcinomas with positive protein expression of *CCND1*.** The pictures illustrate in

100 and 400 times an overexpression in 90% of cells (+++) of Cyclin D1 in breast carcinoma.



**FIGURE 2. Immunohistochemical study in ductal breast carcinoma, negative for protein expression of *CCND1*.** The pictures illustrate, in 100x and 400x, the expression of Cyclin D1 negativity in breast carcinoma cells.

### Level of mRNA and clinicopathological parameters

The Cyclin D1 mRNA levels were analyzed in relation to other five parameters: age, histological grade, positivity or negativity of hormone receptors (ER and PR) and HER2 protein (Table 2). The analysis of the mRNA levels of Cyclin D1 expressed in tumors HER2+ versus HER2-, ER+ versus ER- and PR+ versus PR- demonstrated, with a 5% significance level, no significantly difference ( $P= 0.2580, 0.1019$  and  $0.8949$ , respectively).

Grades I and II were grouped versus grade III, and the differences in variation among samples of these groups were not significant ( $P= 0.2713$ ).

The samples were also separated according to the age of the patients into two groups: tumors from patients over 50 years and from patients aged 50 years or less, in order to group patients post and premenopausal, respectively. In this analysis, the differences observed in *CCND1* mRNA level between these two groups were not significant ( $P = 0.4053$ ).

**TABLE 2. Clinicopathologic characteristics analyzed and the respective percentage of patients for each characteristic.**

	Percentage of patients (%)	P-value
<i>Lymph node status</i>		0.601
Node-positive	46.2	
Node-negative	53.8	
<i>Age</i>		0.4053
≤ 50 years	43.6	
> 50 years	56.4	
<i>Histological grade</i>		0.2713
I + II	64.1	
III	35.9	
<i>ER status</i>		0.1019
+	79.4	
-	20.6	
<i>PR status</i>		0.8949
+	52.9	
-	47.1	
<i>HER2 status</i>		0.2580
+	58.8	
-	41.2	

## DISCUSSION

Considering that the metastasis in axillary lymph nodes represent a first step in tumor progression, this study was conducted to determine if *CCND1* gene presents a differential expression between patients with metastatic axillary lymph nodes and the ones free of metastasis.

The evaluation of gene expression of *CCND1*, assessing both mRNA and protein, showed high expression in both groups but with no significant differences between them. Bièche *et al.* [10] evaluated the prognostic value of the *CCND1* gene analyzing the expression of mRNA and gene amplification in 134 sporadic breast tumors. The authors found no significant correlation between the expression of *CCND1* and the presence of lymph nodes metastasis. Among the clinicopathological parameters analyzed by these authors, the only significant difference was between the overexpression of *CCND1* and the positivity of ER. Guo *et al.* [26], analyzing 140 samples of breast carcinomas, also found no association between overexpression of *CCND1* and the presence of lymph nodes metastasis. However, overexpression of *CCND1* was related to tumor size and disease recurrence. Lee *et al.* [27] when examining 333 breast carcinomas of invasive ductal subtype, found no association between overexpression of Cyclin D1 and the presence of lymph nodes metastasis, but found an association between overexpression of cyclin D1 and ER+ tumors as described by Bièche *et al.* [10]. Although we and other authors have not identified an association between *CCND1* expression levels and the metastatic process in breast cancer, other authors have described it in another type of cancer. Drobnjak *et al.* [28] associated overexpression of cyclin D1 to metastatic prostate cancer. Masuda *et al.* [29] also suggest that overexpression of Cyclin D1 may be used as a prognostic marker for squamous cell carcinomas of the head and neck.

According to Dickson *et al.* [18], the 11q13 region contains several potential oncogenes (for example, *EMSI*, *GSTP1*, *FOSL1*), which may explain the frequent amplification of the region in tumors, not always related to an overexpression of Cyclin D1. Biecher *et al.* [10] who observed that positive and negative ER tumors showed amplification of 11q13 region suggest that *CCND1* amplification may simply be an additional mechanism, and do not represent the main gene in the 11q13 amplicon.

Some authors reported different prognostic values for gene amplification and overexpression of Cyclin D1 protein in breast cancer. The various analysis of the *CCND1* gene on the levels of mRNA and DNA amplification, show that patients with good performance had tumors with increased *CND1* expression without gene amplification, while patients with poor prognosis presented tumor with amplification of *CCND1* gene [10, 15-17]. These data indicate a prognostic importance for gene amplification of *CCND1* in breast cancer, associating it to a worse evolution of patients.

Overexpression of Cyclin D1 protein, however, has often been associated with a poor prognosis in other types of cancers such as lung cancer [30], squamous cell carcinoma of the head and neck [31] and bladder cancer

[32]. In breast cancer, the data on the prognostic value of Cyclin D1 overexpression is still controversial, with authors claiming for a favorable prognosis [20,23,33], others for a poor prognosis [19,24,26,34]; and also for a neutral effect [35]. Recent data on primary breast cancer have directed to a positive predictive value [36,37], while Aaltonen *et al.* [38], associate this overexpression to a poor prognosis on ER+ breast tumors.

In this divergent context, further studies must be performed to clarify the prognostic value of Cyclin D1 overexpression and the relevance of the *CCND1* gene amplification in breast cancer. Therefore, the copy number analysis of the *CCND1* gene may add information regarding the origin of *CCND1* gene amplification in primary breast tumors, in spite there are controversies regarding its prognostic value in this tumor. On the contrary, the diagnostic and prognostic value of Cyclin D1 is well defined in lymphomas, which is a diagnostic criterion in Mantle Cell Lymphoma [39].

In conclusion, the comparative analysis of *CCND1* gene expression in samples of invasive ductal breast carcinomas with and without metastasis in axillary lymph nodes showed no significant difference between these groups. This result suggests that, in these samples, Cyclin D1 has a role in the initial steps of the tumor development but is not related to the process of metastasis. The analysis of copy number of the *CCND1* gene is suggested to complement the results obtained in this study.

## REFERENCES

- [1] Sherr, C. J. (1993). *Mammalian G1 cyclins*. *Cell*, 73, 1059-1065.
- [2] Massague, J. (2004). *G1 cell-cycle control and cancer*. *Nature*, 432, 298-306.
- [3] Neumeister, P.; Pixley, F. J.; Xiong, Y.; Xie, H.; Wu, K.; Ashton, A.; Cammer, M.; Chan, A.; Symon, S., M.; Stanley, E. R.; Pestell, R. G. (2003). *Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages*. *Mol Biol Cell*, 14, 2005-2015.
- [4] Lamb, J.; Ramaswamy, S.; Ford, H. L.; Contreras, B.; Martinez, R. V.; Kittrell, F. S.; Zahnow, C. A.; Patterson, N.; Golub, T. R.; Ewen, M. E. (2003). *A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer*. *Cell*, 114, 323-334.
- [5] Wang, C.; Pattabiraman, N.; Zhou, J. N.; Fu, M.; Sakamaki, T.; Albanese, C.; Li, Z.; Wu, K.; Hulit, J.; Neumeister, P.; Novikoff, P. M.; Brownlee, M.; Scherer, P. E.; Jones, J. G.; Whitney, K. D.; Donehower, L. A.; Harris, E. L.; Rohan, T.; Johns, D. C.; Pestell, R. G. (2003). *Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor-expression and transactivation*. *Mol Cell Biol*, 23, 6159-6173.
- [6] Pestell, R. G. (2013). *New roles of Cyclin D1*. *The American Journal of Pathology*, 183, 1.
- [7] Casimiro, M. C.; Velasco-Velázquez, M.; Aguirre-Alvarado, C.; Pestell, R. G. (2014). *Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape*. *Informa Healthcare*, 23, 3, 295-304.
- [8] Motokura, T.; Arnold, A. (1993). *PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene: genomic organization, 5' DNA sequence, and sequence of a tumor-specific rearrangement breakpoint*. *Genes Chromosomes Cancer*, 7, 89-95.
- [9] Kim, J. K.; Diehl, J. A. (2009). *Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer*. *J. Cell. Physiol.* 220, 2, 292-296.
- [10] Bièche, I., Olivi, M., Nogues, C., Vidaud, M.; Lidereau, R. (2002). *Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays*. *Br J Cancer*, 86, 580-586.
- [11] Buckley, M. F.; Sweeney, K. J. E.; Hamilton, J. A.; Sim, K. L.; Manning, D. L.; Uicholson, R. I.; Defazio, A.; Watts, C. K. M.; Musgrove, E. A.; Sutherland, R. L. (1993). *Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer*. *Oncogene*, 8, 2127-2133.
- [12] Bartkova, J.; Lukas, J.; Muller, H.; Lutzhoft, D.; Strauss, M.; Bartek, J. (1994). *Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer*. *Int J Cancer*, 57, 353-361.
- [13] Gillett, C. E.; Fantl, V.; Smith, R.; Fisher, C.; Bartek, J.; Dickson, C.; Barnes, D.; Peters, G. (1994). *Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining*. *Cancer Res*, 54, 1812-1817.
- [14] Wang, T.; Cardiff, R.; Zukerberg, L.; Lees, E.; Arnold, A.; Schmidt, E. V. (1994). *Mammary hyperplasia and carcinomas MMTV-cyclin D1 transgenic mice*. *Nature*, 369, 669-671.
- [15] Ali, I. U.; Merlo, G.; Callahan, R.; Lidereau, R. (1989). *The amplification unit on chromosome 11q13 in aggressive primary human breast tumors entails the bcl-1, int-2 and hst loci*. *Oncogene*, 4, 89-92.
- [16] Borg, A.; Sigurdsson, H.; Clark, G. M.; Ferno, M.; Fuqua, S. A.; Olsson, H.; Killander, D.; MC Gurie, W. L. (1991). *Association of INT2/HST1 amplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis*. *Br J Cancer*, 63, 136-142.
- [17] Henry, J. A.; Hennessy, C.; Levett, D. L.; Lennard, T. W.; Westley, B. R.; MAY, F. E. (1993). *Int-2 amplification in breast cancer: association with decreased survival and relationship to amplification of c-erbB-2 and c-myc*. *Int J Cancer*, 53, 774-780.
- [18] Dickson, C.; Fantl, V.; Gillett, C.; Brookesa, S.; Bartek, J.; Smith, R.; Fisher, C.; Barnes, D.; Peters, G. (1995). *Amplification of chromosome band 1 q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer*. *Cancer Letters*, 90, 43-50.
- [19] MC Intosh, G. G.; Anderson, J. J.; Milton, I.; Steward, M.; Parr, A. H.; Thomas, M. D.; Henry, J. A.; Angus, A.; Lennard, T. W. J.; Horne, C. H. W. (1995). *Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer*. *Oncogene*, 11, 885-891.
- [20] Gillett, C.; Smith, P.; Gregory, W.; Richards, M.; Millis, R.; Peters, G.; Barnes, D. (1996). *Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer*. *Int J Cancer (Pred Oncol)*, 69, 92-99.
- [21] Barbareschi, M.; Pelosio, P.; Caffo, O.; Butitta, F.; Pellegrini, S.; Barbazza, R.; Dallapalma, P.; Bevilacqua, G.; Marchetti, A. (1997). *Cyclin-D1-gene amplification*



- and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathological characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21WAF1 immunohistochemical expression. *Int J Cancer (Pred Oncol)*, 74, 171-174.
- [22] Jares, P.; Rey, M. J.; Fernandez, P. L.; Campo, E.; Nadal, A.; Munoz, M.; Mallofre, C.; Muntane, J.; Nayach, I. L.; Estape, J.; Cardesa, A. (1997). *Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status*. *J Pathol*, 182, 160-166.
- [23] Nielsen, N. H.; Emdin, S. O.; Cajander, J.; Landberg, G. (1997). *Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein*. *Oncogene*, 14, 295-304.
- [24] Kenny, F. S.; Hui, R.; Musgrove, E. A.; Gee, J. M. W.; Blamey, R. W.; Nicholson, R. I.; Sutherland, R. L.; Robertson, J. F. R. (1999). *Overexpression of Cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 5, 2069-2076.
- [25] Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-CT Method*. *Methods*, 25, 402-408.
- [26] Guo, L.; Gao, P.; Wu, Y.; Jian, W.; Hao, C.; Li, H.; Li, X. (2007). *Alteration of Cyclin D1 in Chinese Patients with Breast Carcinoma and its Correlation with Ki-67, pRB, and p53*. *Archives of Medical Research*, 38, 846-852.
- [27] Lee, A.; Park, W. C.; Yim, H. W.; Lee, M. A.; Park, G.; Lee, K. Y. (2007). *Expression of c-erbB2, cyclin D1 and Estrogen Receptor and their Clinical Implications in the Invasive Ductal Carcinoma of the Breast*. *Jpn J Clin Oncol*, 37, 9, 708-714.
- [28] Drobnyak, M.; Osman, I.; Scher, H. I.; Fazzari, M.; Cordon-Cardo, C. (2000). *Overexpression of Cyclin D1 Is Associated with Metastatic Prostate Cancer to Bone*. *Clinical Cancer Research*, 6, 1891-1895.
- [29] Masuda, M.; Suzui M.; Yasumatu, R.; Nakashima, T.; Kuratomi, Y.; Azuma, K.; Tomita, K.; Komiyama, S.; Weinstein, I. B. (2002). *Constitutive Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Correlates with Cyclin D1 Overexpression and May Provide a Novel Prognostic Marker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Cancer Research*, 62, 3351-3355.
- [30] Jin, M.; Inoue, S.; Umemura, T.; Moriya, J.; Arakawa, M.; Nagashima, K.; Kato, H. (2001). *Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II*. *Lung Cancer*, 34, 2, 207-218.
- [31] Vicente, J. C.; Herrero-Zapatero, A.; Fresno, M. F.; Lopez-Arnanz, J. S. (2002). *Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance*. *Oral Oncol*, 38, 301-308.
- [32] Shariat, S. F.; Ashfaq, R.; Sagalowsky, A. I.; Lotan, Y. (2006). *Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis*. *Hum Pathol*, 37, 1568-1576.
- [33] Yang, X. R.; Sherman, M. E.; Rimm, D. L.; Lissowska, J.; Brinton, L. A.; Peplonska, B.; et al. (2007). *Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 16, 439-443.
- [34] Umekita, Y.; Ohi, Y.; Sagara, Y.; Yoshida, H. (2002). *Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients*. *Int J Cancer*, 98, 415-418.
- [35] Dublin, E. A.; Patel, N. K.; Gillett, C. E.; Smith, P.; Barnes, D. M. (1997). *p53 immunohistochemical staining and survival after adjuvant chemotherapy for breast cancer*. *Int J Cancer*, 74, 605-608.
- [36] El-Hafez, A. A.; Shawky, A. E. A.; Hasan, B. (2013). *Cyclin D1 overexpression associates with favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma*. *Cancer Biomarkers*, 12.
- [37] Mylona, E.; Tzelepis, K.; Theohari, I.; Giannopoulou, I.; Papadimitriou, C.; Nakopoulou, L. (2013). *Cyclin D1 in invasive breast carcinoma: favourable prognostic significance in unselected patients and within subgroups with an aggressive phenotype*. *Histopathology*, 62, 472-480.
- [38] Aaltonen, K.; Amini, R. M.; Landberg, G.; Eerola, H.; Aittomaki, K.; Heikkila, P.; Nevanlinna, H.; Blomqvist, C. (2009). *Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat.*, 113, 1, 75-82.
- [39] Vose, J. M. (2013). *Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management*. *Am J Hematol.*, 88, 12, 1082-1088.

## 6. DISCUSSÃO

Aspectos relacionados às alterações no gene *CCND1* em tumores, bem como, acerca das funções desempenhadas pela proteína Ciclina D1, têm sido muito estudados desde a sua identificação em 1991 (MOTOKURA *et al.*, 1991). Como é amplamente conhecido, a superexpressão da Ciclina D1 é bem caracterizada em diversos tipos de cânceres, tais como: câncer de pulmão de células não-pequenas (BETTICHER *et al.*, 1996; JIN *et al.*, 2001); carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (BARTKOVA *et al.*, 1995; MASUDA *et al.*, 2002); carcinomas de esôfago (SHAMMA *et al.*, 2000) e carcinomas mamários (BARNES & GILLET, 1998; LAMB *et al.*, 2003). Em linfoma de células do manto, a superexpressão da Ciclina D1 é uma consequência da translocação cromossômica t(11;14) e é um marcador molecular da doença (VOSE, 2013).

Considerando que as metástases em linfonodos axilares representam um primeiro passo na progressão tumoral, o presente estudo foi conduzido para determinar se havia relação entre a expressão de *CCND1* e a presença de metástases em linfonodos axilares.

A avaliação da expressão gênica de *CCND1*, ao nível de mRNA e proteína, não mostrou diferenças significativas entre os tumores com metástases em linfonodos (LNP) quando comparados aos tumores não-metastáticos (LNN), apresentando alta expressão em ambos os grupos. Nossa análise imunohistoquímica apresentou um índice relativamente alto para a positividade de expressão nas amostras analisadas (90% apresentaram superexpressão da proteína Ciclina D1). A literatura descreve, em geral, cerca de 30 a 50%. No entanto, análises imunohistoquímicas, em geral, são difíceis de serem comparadas devido à especificidade dos anticorpos, preparação das lâminas e heterogeneidade das amostras. Vale ressaltar que os 10% que apresentaram expressão negativa de Ciclina D1, correspondiam a tumores não-metastáticos (LNN), com baixos níveis de mRNA de *CCND1*.

Bièche e colaboradores (2002), também avaliaram o valor prognóstico do gene *CCND1*, analisando a expressão ao nível de mRNA e a amplificação gênica em 134 tumores esporádicos de mama. Neste trabalho, os autores também não encontraram relação significativa, em carcinoma ductal invasor (CDI), quanto a expressão de *CCND1* e a presença de metástases em

linfonodos. Outros autores (GUO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007) também não encontraram relação entre a expressão gênica de *CCND1* e a presença de metástases em linfonodos.

Enquanto que, para o câncer de mama não encontramos qualquer relação entre a expressão de *CCND1* e o processo de metastatização, autores como Drobnjak e colaboradores (2000) associaram a superexpressão da Ciclina D1 ao câncer de próstata metastático. Masuda e colaboradores (2002) também sugerem que a superexpressão de Ciclina D1 pode ser utilizada como um marcador prognóstico em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço.

Embora não tenhamos encontrado nenhuma relação entre a expressão de *CCND1* e os parâmetros clínico-patológicos analisados, outros trabalhos relatam algumas associações. Entre os parâmetros clínico-patológicos analisados por Bièche *et al.* (2002), a única relação significativa foi entre a superexpressão de *CCND1* (sem amplificação gênica) e a positividade de ER, sendo 96,9% dos tumores analisados por eles, ER+. Guo e colaboradores (2007) analisaram a expressão gênica, ao nível de mRNA e proteína, de 140 amostras de carcinomas mamários. Em suas análises, a superexpressão de *CCND1* foi relacionada ao tamanho do tumor e recorrência da doença. Assim como relatado no trabalho de Bièche *et al.* (2002), Lee e colaboradores (2007), analisando 333 tumores mamários do subtipo CDI, encontraram associação entre a superexpressão da Ciclina D1 e tumores ER+. No mais, também associaram-na ao tamanho do tumor, onde tumores pequenos foram associados a superexpressão da proteína Ciclina D1. De acordo com Mohammadzadeh e colaboradores (2013), a relação inversa que encontraram entre a superexpressão da Ciclina D1 e o grau tumoral (tumores de grau I – bem diferenciados - apresentavam superexpressão da Ciclina D1) e, a associação positiva em relação aos receptores hormonais ER e PR, sugere que a Ciclina D1 pode atuar direta ou indiretamente na maturação e diferenciação das células tumorais. Tobin e colaboradores (2011) também evidenciaram uma associação entre a superexpressão da Ciclina D1 e um menor grau tumoral.

Corroborando com o descrito na literatura, a maioria dos tumores analisados no presente trabalho foram ER+ (79,4%). No entanto, contrastando

com outros resultados (BIÈCHE *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2007; ELSHEIKH *et al.*, 2008; AALTONEN *et al.*, 2009; TOBIN *et al.*, 2011; MOHAMMADIZADEH *et al.*, 2013), nenhuma associação entre a superexpressão da Ciclina D1 e a positividade para o receptor hormonal ER foi encontrada. Elsheikh e colaboradores (2008), evidenciaram forte associação entre **amplificação de CCND1** e **superexpressão da Ciclina D1** e a positividade para os receptores hormonais ER e PR, o que, segundo eles, sustenta o conceito de que a alta expressão de ER pode cooperar na manutenção dos níveis de expressão da proteína Ciclina D1. Além disso, o gene *CCND1* é induzido por fatores de crescimento e pelo estrogênio (GAO e ZELENKA, 1997). Assim, ele pode aumentar o efeito competitivo do Tamoxifeno, que tem provado ser um tratamento eficiente em pacientes com câncer de mama ER+ (STENDAHL *et al.*, 2004). Embora seja frequente a associação entre tumores ER+ e a **superexpressão da proteína Ciclina D1**, Reis-filho e colaboradores (2006), não encontraram associação entre a **amplificação gênica de CCND1** e a positividade de receptores hormonais como o ER.

Vários trabalhos desde a década de 90 têm descrito que em torno de 15% dos tumores de mama apresentam **amplificações gênicas em CCND1**, no entanto a **superexpressão proteica da Ciclina D1** tem se mostrado mais frequente, ocorrendo entre 30 a 50% dos tumores primários de mama (ALI *et al.*, 1989; BORG *et al.*, 1991; HENRY *et al.*, 1993; GILLETT *et al.*, 1994; DICKSON *et al.*, 1995; MCINTOSH *et al.*, 1995; GILLETT *et al.*, 1996; BARBARESCHI *et al.*, 1997; JARES *et al.*, 1997; NIELSEN *et al.*, 1997; KENNY *et al.*, 1999; BIÈCHE *et al.*, 2002). Estes resultados, evidenciam que a superexpressão da Ciclina D1 nem sempre deve ser atribuída as alterações gênicas como as amplificações. Outros mecanismos como a regulação pós-transcricional através de miRNAs e mecanismos pós-traducionais, como a perturbação da exportação nuclear e degradação da Ciclina D1, também provocam o acúmulo da proteína Ciclina D1 no núcleo (KIM & DIEHL, 2009). Sun e colaboradores (2008), relacionam o papel que o miR-34a, um regulador negativo de *CCND1*, desempenha, promovendo a *down-regulation* de *CCND1* na tradução e reduzindo a estabilidade do mRNA, simultaneamente. No entanto, alguns autores evidenciam forte associação entre a **amplificação**

**gênica de CCND1** e a **superexpressão da Ciclina D1** (REIS-FILHO *et al.*, 2006; ELSHEIKH *et al.*, 2008), contradizendo o que tem sido amplamente observado.

Decorre que, ao fato de os tumores apresentarem diferentes frequências para **amplificação** e **superexpressão** do gene *CCND1*, na literatura, autores descrevem valores prognósticos diferentes para a **amplificação gênica** e a **superexpressão da proteína Ciclina D1** no câncer de mama. A **superexpressão da Ciclina D1** tem sido frequentemente associada a um prognóstico ruim em alguns tipos de cânceres, como no câncer de pulmão (JIN *et al.*, 2001), carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (VICENTE *et al.*, 2002) e câncer de bexiga (SHARIAT *et al.*, 2006). No câncer de mama, no entanto, as várias análises do gene *CCND1* acerca dos níveis de mRNA e DNA, mostram que pacientes com boa evolução tinham tumores com aumento da expressão de *CCND1* (**sem amplificação gênica**), enquanto que as pacientes com pior evolução tinham tumores **com amplificação** do gene *CCND1* (ALI *et al.*, 1989; BORG *et al.*, 1991; HENRY *et al.*, 1993; BIÈCHER *et al.*, 2002), atribuindo um valor prognóstico a **amplificação gênica**. Quanto ao valor prognóstico da **superexpressão da Ciclina D1**, ainda é controverso. Alguns autores têm relacionado esta superexpressão a um prognóstico favorável (GILLETT *et al.* 1996; NIELSEN *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2007; EL-HAFEZ, SHAWKY & HASAN, 2013; MYLONA *et al.*, 2013), outros associam a um mau prognóstico (McINTOSH *et al.*, 1995; KENNY *et al.*, 1999; UMEKITA *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2007) e Dublin e colaboradores (1997) sugerem que a expressão da Ciclina D1 não tem correlação com o prognóstico das pacientes. Aaltonen e colaboradores (2009), associam a superexpressão da Ciclina D1 com um mau prognóstico em tumores mamários ER+.

Segundo Dickson e colaboradores (1995), a região 11q13 contém vários candidatos a oncogenes (como por exemplo, o *EMS1*), o que pode justificar sua frequente amplificação descrita em tumores, nem sempre relacionada diretamente a superexpressão da Ciclina D1. Biècher e colaboradores (2002), diante da observação de que tumores ER positivos e negativos apresentavam amplificação da região 11q13, sugerem que a amplificação de *CCND1* possa ser simplesmente um mecanismo adicional, não se caracterizando como o principal *amplicon* de 11q13.

Diante da alta frequência de alterações em *CCND1* e na expressão da Ciclina D1, observadas em diversos tipos de cânceres, fica claro que alguma forma alternativa de proteína Ciclina D1 poderia ser associada a um elevado risco de desenvolvimento da doença. Um SNP frequente, G/A870, tem sido associado ao processamento alternativo do gene *CCND1*, sendo bastante estudado em relação à susceptibilidade no desenvolvimento do câncer coloretal (KONG *et al.*, 2000; 2001).

A isoforma Ciclina D1b resultante do processamento alternativo de *CCND1*, é uma forma truncada da proteína e tida como a forma oncogênica da Ciclina D1. Esta isoforma está ligada à alta incidência de tumores incluindo câncer de pulmão (BETTICHER *et al.*, 1995), câncer coloretal (KONG *et al.*, 2000; BALA & PELTOMAKI, 2001; KONG *et al.*, 2001; LE MARCHAND *et al.*, 2003), câncer de próstata (WANG *et al.*, 2003b) e câncer de bexiga (WANG *et al.*, 2002). Hosokawa e colaboradores (1997), no entanto, ao estudarem a expressão desta isoforma (Ciclina D1b) em câncer de mama, relataram que ambos os transcritos de *CCND1* foram expressos em tumores primários de mama quanto nas linhagens celulares de câncer de mama. No entanto, de acordo com as análises realizadas por eles, a quantidade do transcrito variante (D1b) foi mínima em comparação com a do transcrito D1a, tanto nos tumores primários de mama quanto nas linhagens celulares. Segundo os próprios autores, esta constatação reduziu a possibilidade de que o transcrito variante D1b, possa desempenhar um papel mais significativo que a Ciclina D1a, na patogênese do câncer de mama. Estudos controlados *in vivo* e *in vitro*, demonstraram o comportamento oncogênico da proteína variante Ciclina D1b, e até mesmo da Ciclina D1a, em camundongos transgênicos e linhagens celulares (JIANG *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1994). Deste modo, o comportamento oncogênico da Ciclina D1b ainda não pode ser desconsiderado.

Assim como descrito no trabalho de Hosokawa e colaboradores (1997) para o câncer de mama, Betticher e colaboradores (1995) ao analisarem amostras de câncer de pulmão e tecidos pulmonares normais mostrou semelhança nas quantidades dos dois transcritos. Neste tecido, mais estudos que investiguem a expressão proteica, com construção de anticorpos que diferenciem as proteínas D1a e D1b, poderá fornecer mais dados acerca da

contribuição funcional de cada isoforma da Ciclina D1 no processo do câncer. Além disso, novos ensaios de expressão gênica podem ser desenhados para identificar cada um destes transcritos individualmente, contribuindo para complementar os dados obtidos no presente trabalho, onde não se diferenciou os transcritos e as diferentes isoformas da Ciclina D1. Além de uma análise da expressão gênica, ao nível de mRNA e proteína, específica para cada transcrito do *CCND1* (D1a e D1b), uma análise de genotipagem também é sugerida, visando identificar se há alguma relação entre risco aumentado para o desenvolvimento de tumores mamários metastáticos e determinados genótipos.

Alguns trabalhos relacionam a amplificação e a superexpressão de *CCND1* a resposta e tratamento com Tamoxifeno. Bostner e colaboradores (2007), descreveram a amplificação de *CCND1* como preditor de recorrência tumoral e resistência ao tratamento coadjuvante com Tamoxifeno em tumores provenientes de pacientes em pós-menopausa. Mais recentemente, Lundgren e colaboradores (2012) relacionaram os efeitos da amplificação gênica em *CCND1* e a superexpressão da Ciclina D1 sobre a recorrência de cânceres de mama em pacientes em pós-menopausa tratadas com Tamoxifeno. Stendahl e colaboradores (2004), sugerem a superexpressão da Ciclina D1 como um fator preditivo negativo para a resposta ao Tamoxifeno em pacientes com câncer de mama pós-menopausa. Já em tumores mamários ER+, a superexpressão da Ciclina D1 foi associada a um resultado clínico favorável com melhor resposta ao Tamoxifeno (HAN *et al.*, 2003; HWANG *et al.*, 2003).

Muitos trabalhos vêm sendo desempenhados, acerca das alterações de *CCND1* e suas implicações no câncer. No entanto, resultados conflitantes sobre o impacto prognóstico da **superexpressão da proteína Ciclina D1** no câncer de mama têm sido relatados (GILLETT *et al.*, 1994; McINTOSH *et al.*, 1995; PETERS *et al.*, 1995; PELOSIO *et al.*, 1996; SESHADRI *et al.*, 1996; BARNES, 1997; TAKANO *et al.*, 1999; BIÈCHE *et al.*, 2002; LODEN *et al.*, 2002; NAIDU *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2003; EL-HAFEZ, SHAWKY & HASAN *et al.*, 2013; MYLONA *et al.*, 2013). Neste sentido, mais estudos devem ser realizados na tentativa de solucionar as discordâncias existentes na literatura acerca do valor prognóstico da **superexpressão da Ciclina D1**, bem como dos vários mecanismos envolvidos na superexpressão desta proteína em

tumores, que se mostram independentes da amplificação gênica. Beroukhim e colaboradores (2010) relacionam a amplificação de *CCND1* como uma das alterações no número de cópias mais comuns em cânceres humanos, assim a análise do número de cópias do gene *CCND1* é sugerida como dado necessário à complementação dos resultados obtidos no presente trabalho, contribuindo com uma análise ao nível de DNA. As informações acerca dos níveis de DNA, mRNA e proteína, em conjunto, poderão elucidar acerca de um valor prognóstico do gene *CCND1* no câncer de mama.



## 7. CONCLUSÕES

Desde a década de 90, vem se intensificando os estudos acerca das diversas funções que a Ciclina D1 desempenha, desde a iniciação da tumorigênese até a progressão tumoral com a colonização metastática. A análise comparativa da expressão gênica de *CCND1*, realizada no presente trabalho, não mostrou expressão diferencial para amostras tumorais com e sem metástase em linfonodo axilar. Sugerindo que, nestas amostras, a Ciclina D1 não está relacionada ao processo inicial da metastatização, e portanto não exerce função significativa nesta etapa da progressão tumoral.

Não houve nenhuma relação entre o nível de mRNA de *CCND1* e os parâmetros clínico-patológicos analisados.

Na expressão gênica da Ciclina D1, vários fatores devem ser considerados, uma vez que, os mecanismos até então descritos, os quais promovem a superexpressão da Ciclina D1, são diversos, envolvendo alterações gênicas e regulações pós-transcricionais e pós-traducionais. Considerando que alguns autores têm descrito um valor prognóstico diferente para a amplificação gênica e a superexpressão de *CCND1*, a análise do número de cópias do DNA, neste mesmo grupo amostral, é sugerida para complementar os resultados aqui apresentados.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão do câncer mama pode fornecer estratégias para identificar novos marcadores prognósticos, bem como melhores tratamentos para a doença. Assim, tem-se uma grande expectativa acerca da compreensão dos mecanismos moleculares desempenhados pela Ciclina D1, que justifiquem sua superexpressão, amplamente relatada, em diversos tipos de cânceres. Neste sentido, novas funções estão sendo descritas atualmente para Ciclina D1.

## REFERÊNCIAS

AALTONEN, K.; AMINI, R.M.; LANDBERG, G.; EEROLA, H.; AITTO MAKI, K.; HEIKKILA, P.; NEVANLINNA, H.; BLOMQVIST, C. **Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, v.113, n.1, p.75-82, 2009.

ABDUL-RASOOL, S.; KIDSON, S.H.; PANIERI, E.; DENT, D.; PILLAY, K.; HANEKOM, G.S. **An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes.** *Journal of Clinical Pathology*, v.59, p.289-297, 2006.

ACLOQUE, H.; ADAMS, M.S.; FISHWICK, K.; BRONNER-FRASER, M.; NIETO, M.A. **Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.** *Journal of Clinical Investigation*, v.119, n.6, p.1438-1449, 2009.

AGGARWAL, P.; LESSIE, M.D.; LIN, D.I.; PONTANO, L.; GLADDEN, A.B.; NUSKEY, B.; GORADIA, A.; WASIK, M.A.; KLEIN-SZANTO, A.J.; RUSTGI, A.K.; BASSING, C.H.; DIEHL, J.A. **Nuclear accumulation of cyclin D1 during S phase inhibits Cul4-dependent Cdt1 proteolysis and triggers p53-dependent DNA rereplication.** *Genes Dev*, v.21, n.22, p.2908-2922, 2007.

ALAO, J.P. **The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention.** *Molecular Cancer*, v.6, 2007.

AL-HAJJ, M.; WICHA, M.S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.100, p.3983-3988, 2003.

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

ALT, J.R.; CLEVELAND, J.L.; HANNINK, M.; DIEHL, J.A. **Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation.** *Genes Dev*, v.14, n.24, p.3102-3114, 2000.

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

AMENDOLA, L.C.B.; VIEIRA, R.A. **A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.51, n.4, p.325-330, 2005.

ARNOLD, A.; PAPANIKOLAOU, A. **Cyclin D1 Cancer Pathogenesis.** *Journal of Clinical Oncology*, v.23, n.18, p.4215-4224, 2005.

AUTEXIER, C.; GREIDER, C.W. **Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis.** Elsevier Science, v.21, p.387-391, 1996.

BALA, S.; PELTOMAKI, P. **CYCLIN D1 as a genetic modifier in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.** *Cancer Res*, v.61, p.6042-6045, 2001.

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

BANDI, N.; *et al.* **miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer.** *Cancer Res.*, v.69, p.5553-5559, 2009.

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

BARBASH, O.; ZAMFIROVA, P.; LIN, D.I.; CHEN, X.; YANG, K.; NAKAGAWA, H.; LU, F.; RUSTGI, A.K.; DIEHL, J.A. **Mutations in Fbx4 inhibit dimerization of the SCF (Fbx4) ligase and contribute to cyclin D1 overexpression in human cancer.** *Cancer Cell*, v.14, n.1, p.68-78, 2008.

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

BARNES, D.M. **Cyclin D1 in mammary carcinoma.** *J Pathol*, v.181, p.267-269, 1997.

BARNES, D.M.; GILLETT, C.E. **Cyclin D1 in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, v.52, p.1-15, 1998.

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

BARTKOVA, J.; LUKAS, J.; MULLER, H.; STRAUSS, M.; GUSTERSON, B.; BARTEK, J. **Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer.** *Cancer Res*, v.55, n.4, p.949-956, 1995.

BAUER, K.R.; BROWN, M.; CRESS, R.D.; *et al.* **Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative**

**phenotype: A population-based study from the California.** *Cancer Registry*, v.109, p.1721-1728, 2007.

BENZENO, S.; LU, F.; GUO, M.; BARBASH, O.; ZHANG, F.; HERMAN, J.G.; KLEIN, P.S.; RUSTGI, A.; DIEHL, J.A. **Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1.** *Oncogene*, v.25, n.47, p.6291-6303, 2006.

BEROUKHIM, R. *et al.* **The landscape of somatic copynumber alteration across human cancers.** *Nature*, v.463, p.899-905, 2010.

BERTUCCI, F.; HOULGATTE, R.; GRANJEAUD, S.; NASSER, V.; LORIOD, B.; BEAUDOING, E.; HINGAMP, P.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; BIRNBAUM, D.; NGUYEN, C. **Prognosis of breast cancer and gene expression profiling using DNA arrays.** *Annals of the New York Academy of Science*, v.975, p.217-231, 2002.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. **Proteomics of breast cancer.** *Molecular e Cellular Proteomics*, v.5, p.1772-1786, 2006.

BETTICHER, D.C.; THATCHER, N.; ALTERMATT, H.J.; HOBAN, P.; RYDER, W.D.; HEIGHWAY, J. **Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript.** *Oncogene*, v.11, p.1005-1011, 1995.

BETTICHER, D.C.; HEIGHWAY, J.; HASLETON, O.S.; ALTERMATT, H.J.; RYDER, W.D.J.; CERNY, T.; THATCHER, N. **Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer.** *British Journal of Cancer*, v.73, p.294-300, 1996.

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

BONCI, D.; *et al.* **The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities.** *Nature Med.*, v.14, p.1271-1277, 2008.

BORG, A.; SIGURDSSON, H.; CLARK, G.M.; FERNO, M.; FUQUA, S.A.; OLSSON, H.; KILLANDER, D.; MCGURIE, W.L. **Association of INT2/HST1 amplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis.** *Br J Cancer*, v.63, p.136-142, 1991.

BOSCH, F.; JARES, P.; CAMPO, E.; LOPEZ-GUILLERMO, A.; PIRIS, M.A.; VILLAMOR, N.; TASSIES, D.; JAFFE, E.S.; MONTSERRAT, E.; ROZMAN, C. **PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma.** *Blood*, v.84, p.2726-2732, 1994.

BOSTNER, J.; WALTERSSON, M.A.; FORNANDER, T.; SKOOG, L.; NORDENSKJOLD, B.; STAL, O. **Amplification of CCND1 and PAK1 as**

**predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer.** *Oncogene*, v.26, p.6997-7005, 2007.

BOMBARDIERI, E.; GIANNI, L.; BONADONNA, G. **Breast Câncer: Nuclear medicine in diagnosis and therapeutics options.** Berlin: Springer, 2008.

BRAAKHUIS, B.J. *et al.* **A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications.** *Cancer Res.* v.63, 1727-1730, 2003.

BRADBURY, A.R.; OLOPADE, O.I. **Genetic susceptibility to breast cancer.** *Reviews in Endocrine e Metabolic Disorders*, v.8, n.3, p.255-267, 2007.

BUCKLEY, M.F.; SWEENEY, K.J.E.; HAMILTON, J.A.; SIM, K.L.; MANNING, D.L.; UICHOLSON, R.I.; DEFAZIO, A.; WATTS, C.K.M.; MUSGROVE, E.A.; SUTHERLAND, R.L. **Expression and amplification of cyclin genes in human breast câncer.** *Oncogene*, v.8, p.2127-2133, 1993.

BUSTIN, S.A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol*, v.25, p.169-193, 2000.

CARMONA, F.J.; VILLANUEVA, A.; VIDAL, A.; MUÑOZ, C.; PUERTAS, S.; PENIN, R.M.; GOMÀ, M.; LUJAMBIO, A.; PIULATS, J.M.; MESÍA, R.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, M.; MANÓS, M.; CONDOM, E.; ECCLES, S.A.; ESTELLER, M. **Epigenetic disruption of cadherin-11 in human cancer metastasis.** *Journal of Pathology*, v.228, p.230-240, 2012.

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

CHAO, Y.L.; SHEPARD, C.R.; WELLS, A. **Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition.** *Molecular Cancer*, v.9, n.179, 2010.

CHEANG, M.C.U.; VODUC, D.; BAJDIK, C.; *et al.* **Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype.** *Clin Cancer Res*, v.14, p.1368-1376, 2008.

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

CHENG, M.; OLIVIER, P.; DIEHL, J.A.; FERRO, M.; ROUSSEL, M.F.; ROBERTS, J.M.; SHERR, C.J. **The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts.** *EMBO J*, v.18, n.6, p.1571-1583, 1999.

CHUNG, D.C. **Cyclin D1 in human neuroendocrine: tumorigenesis.** *Ann NY*

*Acad Sci*, v.1014, p.209-217, 2004.

CLARKE, R.B.; *et al.* **Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast.** *Cancer Res.* v.57, p.4987-4991, 1997.

CLARKE, R.B.; *et al.* **P27kip1 expression indicates that steroid receptor-positive cells are a non-proliferating, differentiated subpopulation of the normal human breast epithelium.** *Eur. J. Cancer*, v.36, p.28-29, 2000.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R.C. **Triple-negative breast cancer: therapeutic options.** *Lancet Oncology*, v.8, p.235-244, 2007.

CLEVERS, H. **The cancer stem cell: premises, promises and challenges.** *Nature Medicine*, v.17, n.3, p.313-319, 2011.

COQUERET, O. **Linking cyclins to transcriptional control.** *Gene*, v.299, p.35-55, 2002.

DICKSON, C.; FANTL, V.; GILLETTB, C.; BROOKESA, S.; BARTEK, J.; SMITH, R.; FISHER, C.; BARNES, D.; PETERS, G. **Amplification of chromosome band 1q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer.** *Cancer Letters*, v.90, p.43-50, 1995.

DIEHL, J.A.; ZINDY, F.; SHERR, C.J. **Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway.** *Genes Dev*, v.11, p.957-972, 1997.

DIEHL, J.A.; CHENG, M.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J. **Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.** *Genes Dev*, v.12, n.22, p.3499-3511, 1998.

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

DROBNJAK, M.; OSMAN, I.; SCHER, H.I.; FAZZARI, M.; CORDON-CARDO, C. **Overexpression of Cyclin D1 Is Associated with Metastatic Prostate Cancer to Bone.** *Clinical Cancer Research*, v.6, p.1891-1895, 2000.

DUBLIN, E.A.; PATEL, N.K.; GILLETT, C.E.; SMITH, P.; BARNES, D.M. **p53 immunohistochemical staining and survival after adjuvant chemotherapy for breast cancer.** *Int J Cancer*, v.74, p.605-608, 1997.

DUMITRESCU, R.G.; COTARLA, I. **Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005?** *J Cell Mol Med*, v.9, 2005.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E.S.; WERB, Z. **Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism.** *Dev Cell*, v.18, p.884-901, 2010.

EL-HAFEZ, A.A.; SHAWKY, A.E.A.; HASAN, B. **Cyclin D1 overexpression associates with favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma.** *Cancer Biomarkers*, v.12, 2013.

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

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell*, v.1, p.759-767, 1990.

FIDLER, I.J. **Critical determinants of metastasis.** *Seminars in Cancer Biology*, v.12, n.2, p.89-96, 2002.

FIDLER, I.J. **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nat Rev Cancer*, v.3, p.453-458, 2003.

FÖRSTER, V.T. **Zwischenmolekulares Energiewanderung und Fluoreszenz.** *Annals of Physics (Leipzig)*, v.2, p.55-75, 1948.

FREEMAN, T.C.; LEE, K.; RICHARDSON, P.J. **Analysis of gene expression in single cells.** *Curr Opin Biotechnol*, v.10, n.6, p.579-582, 1999.

FRENG, Q.; SEKULA, D.; MULLER, R.; FREEMANTLE, S.J.; DMITROVSKY, E. **Uncovering residues that regulate cyclin D1 proteasomal degradation.** *Oncogene*, 2007.

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

FU, M.; RAO, M.; BOURAS, T.; WANG, C.; WU, K.; ZHANG, X.; LI, Z.; YAO, T.P.; PESTELL, R.G. **Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment.** *J Biol Chem.*, v.280, p.16934-16941, 2005.

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

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

GEIGER, T.R.; PEEPER, D.S. **Metastasis mechanisms.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1796, n.2, p.293-308, 2009.

GERGER, A.; LANGSENLEHNER, U.; RENNER, W.; WEITZER, T.E.; EDER, T.; YAZDANI-BIUKI, B.; HOFMANN, G.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P. **A**

**multigenic approach to predict breast cancer risk.** *Breast Cancer Res Treat*, v.104, p.159-164, 2007.

GERMAIN, D.; RUSSELL, A.; THOMPSON, A.; HENDLEY, J. **Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286.** *J Biol Chem*, v.275, n.16, p.12074-12079, 2000.

GIBSON, U.; HEID, C.; WILLIAMS, P. **A novel method for real time quantitative RT-PCR.** *Genome Res*, v.6, 1996.

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

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

GINZINGER, D.G. **Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream.** *Experimental Hematology*, v.30, p.503-512, 2002.

GLINSKY, G.V. **Genomic Models of Metastatic. Functional Analysis of Death-From-Cancer Signature Genes Reveals Aneuploid, Anoikis-Resistant, Metastasis-Enabling Phenotype with Altered Cell Cycle Control and Activated Polycomb Group (PcG) Protein Chromatin Silencing Pathway.** *Cell Cycle*, v.5, n.11, p.1208-1216, 2006.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THURLIMANN, B.; SEEN, H.J. **Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer.** *Annals of Oncology*, v. 22, p.1736-1747, 2011.

GOLLIN, S.M. **Mechanisms leading to chromosomal instability.** *Semin. Cancer Biol.*, v.15, p.33-42, 2005.

GONÇALVES, A.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; BERTUCCI, F.; AUDEBERT, S.; TOIRON, Y.; ESTERNI, B.; MONVILLE, F.; TARPIN, C.; JACQUEMIER, J.; HOUVENAEGHEL, G.; CHABANNON, C.; EXTRA, J.; VIENS, P.; BORG, J.; BIRNBAUMF, D. **Protein profiling of human breast tumor cells identifies novel biomarkers associated with molecular subtypes.** *Mol Cell Proteomics*, v.7, n.8, p.1420-1433, 2008.

GUNASINGHE, N.P.A.D.; WELLS, A.; THOMPSON, E.W.; HUGO, H.J. **Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer.** *Cancer Metastasis Rev*, 2012.



GUO, L.; GAO, P.; WU, Y.; JIAN, W.; HAO, C.; LI, H.; LI, X. **Alteration of Cyclin D1 in Chinese Patients with Breast Carcinoma and its Correlation with Ki-67, pRB, and p53.** *Archives of Medical Research* v.38, p.846-852, 2007.

HAN, S.; PARK, K.; BAE, B.N.; KIM, K.H.; KIM, H.J.; KIM, Y.D.; KIM, H.Y. **Cyclin D1 expression and patient outcome after tamoxifen therapy in estrogen receptor positive metastatic breast cancer.** *Oncol Rep*, v.10, p.141-144, 2003.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v.144, p.646-674, 2011.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. **Real time quantitative PCR.** *Genome Res*, v.6, p.986-994, 1996.

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

HOEIJMAKERS, J. H. **Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.** *Nature*, v.411, p.366-374, 2001.

HOSOKAWA, Y.; GADD, M.; SMITH, A.P.; KOERNER, F.C.; SCHMIDT, E.V.; ARNOLDA, A. **Cyclin D 1 (PRADI) alternative transcript b: full-length cDNA cloning and expression in breast cancers.** *Cancer Letters*, v.113, p.123-130, 1997.

HOSOKAWA, Y.; ARNOLD, A. **Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression.** *Genes Chromosomes Cancer*, v.22, p.66-71, 1998.

HUGO, H.; ACKLAND, M.L.; BLICK, T.; *et al.* **Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression.** *Journal of Cellular Physiology*, v.213, p.374-383, 2007.

HULIT, J.; WANG, C.; LI, Z.; ALBANESE, C.; RAO, M.; DI VIZIO, D.; SHAH, S.; BYERS, S.W.; MAHMOOD, R.; AUGENLICHT, L.H.; RUSSELL, R.; PESTELL, R.G. **Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice.** *Mol Cell Biol.*, v.24, p.7598-7611, 2004

HWANG, T.S.; HAN, H.S.; HONG, Y.C.; LEE, H.J.; PAIK, N.S. **Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients.** *Pathol Int*, v.53, n.2, p.74-80, 2003.

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

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

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

JARES, P.; COLOMER, D.; CAMPO, E. **Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics**. *Nat Rev Cancer*, v.7, n.10, p.750-762, 2007.

JIANG, W.; KAHN, S.M.; ZHOU, P.; ZHANG, Y.; CARCACE, A.M.; INFANTE, A.S.; DOI, S.; SANLELLA, R.M.; WEINSTEM, I.B. **Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression**. *Oncogene*, v.8 p.3447-3457, 1993.

JIN, M.; INOUE, S.; UMEMURA, T.; MORIYA, J.; ARAKAWA, M.; NAGASHIMA, K.; KATO, H. **Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II**. *Lung Cancer*, v.34, n.2, p.207-218, 2001.

JONES, R.L.; CONSTANTINIDOU, A.; REIS-FILHO, J.S. **Molecular classification of breast cancer**. *Surgical Pathology*, v.5, p.701-717, 2012.

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

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

KLYMKOWSKY, M.W.; SAVAGNER, P. **Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe**. *Am. J. Pathol*, p.1588-1593, 2009.

KNUDSEN, K.E.; CAVENEE, W.K.; ARDEN, K.C. **D-Type Cyclins Complex with the Androgen Receptor and Inhibit Its Transcriptional Transactivation Ability**. *Cancer Res*, v.59, p.2297-2301, 1999.

- KNUDSEN, K.E.; DIEHL, A.; HAIMAN, C.A.; KNUDSEN, E.S. **Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk.** *Oncogene*, v.25, p.1620-1628, 2006.
- KONG, S.; AMOS, C.I.; LUTHRA, R.; LYNCH, M.; LEVIN, B.; FRAZIER, M.L. **Effects of cyclin D1 polymorphism on age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer.** *Cancer Res*, v.60, p.249-252, 2000.
- KONG, S.; WEI, Q.; AMOS, C.I.; LYNCH, P.M.; LEVIN, B.; ZONG, J.; FRAZIER, M.L. **Cyclin D1 polymorphism and increased risk of colorectal cancer at young age.** *J Natl Cancer Inst*, v.93, p.1106-1108, 2001.
- KOZICZAK, M.; HYNES, N.E. **Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and ErbB2 in regulation of cyclin D1 translation.** *J Biol Chem*, v.279, n.48, p.50004-50011, 2004.
- KUTYAVIN, I.V.; AFONINA, I.A.; MILLS, A.; *et al.* **3' - minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.** *Nucleic Acids Res*, v.28, 2000.
- JIRAWATNOTAI, S.; HU, Y.; MICHOWSKI, W.; ELIAS, J.E.; BECKS, L.; BIENVENU, F.; ZAGOZDZON, A.; GOSWAMI, T.; WANG, Y.E.; CLARK, A.B.; KUNKEL, T.A.; van HARN, T.; XIA, B.; CORRELL, M.; QUACKENBUSH, J.; LIVINGSTON, D.M.; GYGI, S.P.; SICINSKI, P. **A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers.** *Nature*, v.474, p.230-234, 2011.
- LAKHANI, S.R.; *et al.* **Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast.** *J Pathol*, v.189, p.496-503, 1999.
- LAMB, J.; LADHA, M.H.; MCMAHON, C.; SUTHERLAND, R.L.; EWEN, M.E. **Regulation of the Functional Interaction between Cyclin D1 and the Estrogen Receptor.** *Mol Cell Biol*, v.20, p.8667-8675, 2000.
- LAMB, J.; RAMASWAMY, S.; FORD, H.L.; CONTRERAS, B.; MARTINEZ, R.V.; KITTRELL, F.S.; ZAHNOW, C.A.; PATTERSON, N.; GOLUB, T.R.; EWEN, M.E. **A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer.** *Cell*, v.114, p.323-334, 2003.
- LAZARO, J.B.; BAILEY, P.J.; LASSAR, A.B. **Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation.** *Genes Dev.*, v.16, p.1792-1805, 2002.
- LE MARCHAND, L.; SEIFRIED, A.; LUM-JONES, A.; DONLON, T.; WILKENS, L.R. **Association of the cyclin D1 A870G polymorphism with advanced colorectal cancer.** *JAMA*, v.290, p.2843-2848, 2003.

LEE, R.J.; ALBANESE, C.; FU, M.; *et al.* **Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway.** *Mol Cell Biol.*, v.20, p.672-683, 2000.

LEE, A.; PARK, W.C.; YIM, H.W.; LEE, M.A.; PARK, G.; LEE, K.Y. **Expression of c-erbB2, cyclin D1 and Estrogen Receptor and their Clinical Implications in the Invasivel Ductal Carcinoma of the Breast.** *Jpn J Clin Oncol*, v.37, n.9, p.708-714, 2007.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. **Genetic instabilities in human cancers.** *Nature*, v.396, p.643-649, 1998.

LI, Z.; JIAO, X.; WANG, C.; JU, X.; LU, Y.; YUAN, L.; LISANTI, M.P.; KATIYAR, S.; PESTELL, R.G. **Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27(KIP1).** *Cancer Res.*, v.66, p.9986-9994, 2006a.

LI, Z. *et al.* **Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling.** *Mol. Cell. Biol.*, v.26, p.4240-4256, 2006b.

LI, Z.; JIAO, X.; WANG, C.; *et al.* **Alternative cyclin d1 splice forms differentially regulate the DNA damage response.** *Cancer Res.*, v.70, p.8802-8811, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-CT Method.** *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.

LOCKEY, C.; OTTO, E.; LONG, Z. **Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule.** *Biotechniques*, v.24, p.744-746, 1998.

LODEN, M.; STIGHALL, M.; NIELSEN, N.H.; *et al.* **The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRB node.** *Oncogene*, v.21, p.4680-4690, 2002.

LOI, S. **Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers- What have we learnt?** *European Journal of Cancer*, v.44, p.2813-2818, 2008.

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

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

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. **Real-time PCR in virology.** *Nucleic Acids Res*, v.30, p.1292-1305, 2002.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.** *Nat Rev Cancer*, v.9, p.153-166, 2009.

MANI, S.A.; GUO, W.; LIAO, M.J.; EATON, E.N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A.Y.; et al. **The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.** *Cell*, v.133, n.4, p.704-715, 2008.

MASSAGUE, J. **G1 cell-cycle control and cancer.** *Nature*, v.432, p.298-306, 2004.

MASUDA, M.; SUZUI M.; YASUMATU, R.; NAKASHIMA, T.; KURATOMI, Y.; AZUMA, K.; TOMITA, K.; KOMIYAMA, S.; WEINSTEIN, I.B. **Constitutive Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Correlates with Cyclin D1 Overexpression and May Provide a Novel Prognostic Marker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Cancer Research*, v.62, p.3351-3355, 2002.

MCINTOSH, G.G.; ANDERSON, J.J.; MILTON, I.; STEWAED, M.; PARR, A.H.; THOMAS, M.D.; HENRY, J.A.; ANGUS, A.; LENNARD, T.W.J.; HORNE, C.H.W. **Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer.** *Oncogene*, v.11, p.885-891, 1995.

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

MOHAMMADIZADEH, F.; HANI, M.; RANAEE, M.; BAGHERI, M. **Role of Cyclin D1 in Carcinoma.** *Journal of Research in Medical Sciences*, v.18, n.12, p.1021-1025, 2013.

MORENO-BUENO, G.; RODRIGUEZ-PERALES, S.; SANCHEZ-ESTEVEZ, C.; HARDISSON, D.; SARRIO, D.; PRAT, J.; CIGUDOSA, J.C.; MATIAS-GUIU, X.; PALACIOS, J. **Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer.** *Oncogene*, v.22, n.38, p.6115-6118, 2003.

MOTOKURA, T.; BLOOM, T.; KIM, H.G.; JUPPNER, H.; RUDERMAN, J.V.; KRONENBERG, H.M.; ARNOLD, A. **A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene.** *Nature*, v. 350, p.512-515, 1991.

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

MOREL, A.P.; LIEVRE, M.; THOMAS, C.; HINKAL, G.; ANSIEAU, S.; PUISIEUX, A. **Generation of breast cancer stem cells through epithelial–mesenchymal transition.** *PLoS One*, v.3, n.8, 2008.

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTEWER, C.T. **Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.** *BioTechniques*, v.24, n.6, 954-958, 1998.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; *et al.* **Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.** *Nature*, v.410, p.50-56, 2001.

MUISE-HELMERICKS, R.C.; GRIMES, H.L.; BELLACOSA, A.; MALSTROM, S.E.; TSICHLIS, P.N.; ROSEN, N. **Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway.** *J Biol Chem*, v.273, n.45, p.29864-29872, 1998.

MUSGROVE, E.A. **Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation.** *Growth Factors*, v.24, n.1, p.13-19, 2006.

MYLONA, E.; TZELEPIS, K.; THEOHARI, I.; GIANNOPOULOU, I.; PAPANIMITRIOU, C.; NAKOPOULOU, L. **Cyclin D1 in invasive breast carcinoma: favourable prognostic significance in unselected patients and within subgroups with an aggressive phenotype.** *Histopathology*, v.62, p.472-480, 2013.

NAIDU, R.; WAHAB, N.A.; YADAV, M.M.; *et al.* **Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinico-pathological parameters.** *Oncol Rep*, v.9, p.409-416, 2002.

NELSEN, C.J.; KURIYAMA, R.; HIRSCH, B.; *et al.* **Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy.** *J Biol. Chem.*, v.280, p.768-776, 2005.

NEUMAIER, M.; GERHARD, M.; WAGENER, C. **Diagnosis of micrometastases by amplification of tissue-specific genes.** *Gene*, v.159, p.43-47, 1995.

NEUMEISTER, P.; PIXLEY, F.J.; XIONG, Y.; XIE, H.; WU, K.; ASHTON, A.; CAMMER, M.; CHAN, A.; SYMONS, M.; STANLEY, E.R.; PESTELL, R.G. **Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages.** *Mol Biol Cell*, v.14, p.2005-2015, 2003.

NEWMAN, R.M.; MOBASCHER, A.; MANGOLD, U.; KOIKE, C.; DIAH, S.; SCHMIDT, M.; FINLEY, D.; ZETTER, B.R. **Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression.** *J Biol Chem*, v.279, n.40, p.41504-41511, 2004.

NICOLSON, G.L. **Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis.** *Cancer and Metastasis Rev.*, v.12, p.325-343, 1993.

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

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

NOWEL, P.C. **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science*, v.1, p.23-28, 1976.

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

NUSBAUM, R.; ISAACS, C. **Management updates for women with a BRCA1 or BRCA2 mutation.** *Mol Diagn Ther*, v.11, p.133-144, 2007.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. **Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.63, p.125-149, 2007.

OLIVEIRA, S.F.V. **Caracterização da expressão de genes da via de reparo do DNA FA-BRCA e do gene MTAP e sua relação com estratégias terapêuticas em carcinomas mamários.** 125f. Tese (Doutorado em Genética) – Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PARKER, J.S.; MULLINS, M.; CHEANG, M.C.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENBUSH, J.F.; STIJLEMAN, I.J.; PALAZZO, J.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T.O.; ELLIS, M.J.; PEROU, C.M.; BERNARD, P.S. **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** *J Clin Oncol*, v.27, p.1160-1167, 2009.

PEINADO, H.; MARIN, F.; CUBILLO, E.; STARK, H.J.; FUSENIG, N.; NIETO, M.A.; CANO, A. **Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo.** *J Cell Sci*, p.2827-2839, 2004.

PELOSIO, P.; BARBARESCHI, M.; BONOLDI, E.; *et al.* **Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy.** *Ann Oncol*, v.7, p.695-703, 1996.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LONNING, P. E.; BORRESENDALE, A.L.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. **Molecular portraits of human breast tumors.** *Nature*, v.406, p.747-752, 2000.

PEROU, C.M. **Molecular stratification of triple-negative breast cancers.** *Oncologist*, v.16, p.61-70, 2011.

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

PETERS, G.; FANTL, V.; SMITH, R.; *et al.* **Chromosome 11q13 markers and D-type cyclins in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, v.33, p.125–135, 1995.

PETRE-DRAVIAM, C.E.; COOK, S.L.; BURD, C.J.; MARSHALL, T.W.; WETHERILL, Y.B.; KNUDSEN, K.E. **Specificity of cyclin D1 for androgen receptor regulation.** *Cancer Res*, v.63, p.4903-4913, 2003.

PFAFFL, M.W.; HAGELEIT, M. **Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR.** *Biotechn Lett*, v.23, p.275-282, 2001.

PFAFFL, M.W. **Relative quantification, in Real-time PCR.** *International University Line*, p.63-82, 2004.

POLYAK, K.; KATO, J.Y.; SOLOMON, M.J.; SHERR, C.J.; MASSAGUE, J.; ROBERTS, J.M.; KOFF, A. **p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.** *Genes Dev*, v.8, n.1, p.9-22, 1994.

POLYAK, K. **On the birth of breast cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1552, p.1-13, 2001.

POLYAK, K. **Breast cancer: origins and evolution.** *Journal of Clinical Investigation*, v.117, p.3155-3163, 2007.

POLYAK, K.; WEINBERG, R.A. **Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits.** *Nat. Rev. Cancer*, v.9, p.265-273, 2009.

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

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

QIAN, B.Z.; POLLARD, J.W. **Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.** *Cell*, p.39-51, 2010.



QUELLE, D.E.; ASHMUN, R.A.; SHURTLEFF, S.E.; KATO, J.Y.; BAR-SAGI, D., ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J. **Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts.** *Genes Dev*, v.7, p.1559-1571, 1993.

RADERSCHALL, E.; *et al.* **Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis.** *J. Cell Sci.*, v.115, p.153-164, 2002.

RAMOS, E.A.S.; GROCHOSKI, M.; BRAUN-PRADO, K.; SENISKI, G.G.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.S.F.; CAMARGO, A.A.; COSTA, F.F.; KLASSEN, G. **Epigenetic Changes of CXCR4 and Its Ligand CXCL12 as Prognostic Factors for Sporadic Breast Cancer.** *PLoS ONE*, v.6, e29461, 2011.

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

REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N. **Triple negative tumours: a critical review.** *Histopathology*, v. 52, p.108-118, 2008.

REIS-FILHO, J.S.; PUSZTAI, L. **Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction.** *The Lancet*, v.378, n.9805, p.1812-1823, 2011.

REYA, T.; *et al.* **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature*, v.414, p.105-111, 2001.

ROBLES, A.I.; RODRIGUEZ-PUEBLA, M.L.; GLICK, A.B.; *et al.* **Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo.** *Genes Dev.*, v.12, p.2469-2474, 1998.

SAKAMAKI, T.; CASIMIRO, M.C.; JU, X.; QUONG, A.A.; KATIYAR, S.; LIU, M.; JIAO X.; LI, A.; ZHANG. X.; LU. Y.; WANG, C.; BYERS, S.; NICHOLSON, R.; LINK, T.; SHEMLUCK, M.; YANG, J.; FRICKE, S.T.; NOVIKOFF, P.M.; PAPANIKOLAOU, A.; ARNOLD, A.; ALBANESE, C.; PESTELL, R. **Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo.** *Mol Cell Biol.*, v.26, p.5449-5469, 2006.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D.; STRATTON, M.R.; COOPER, C.S. **A census of amplified and overexpressed human cancer genes.** *Nature Rev. Cancer*, v.10, p.59-64, 2010.

SCARFF, R.; TORLONI, F. **Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors.** *World Health Organization*, Geneva, v.2, p.20, 1968.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. **Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's Ct difference" formula.** *J Mol Med*, v.84, p.901-910, 2006.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A.; MILLS, A.G.; GORN, V.; SINGER, M.J.; REED, M.W. **Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods.** *Anal Biochem*, v.285, n.2, p.194-204, 2000.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K.J. **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(t) method.** *Nature Protocols*, v.3, n.6, p.1101-1108, 2008.

SESHADRI, R.; LEE, C.S.; HUI, R.; *et al.* **Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis.** *Clin Cancer Res*, v.2, p.1177-1184, 1996.

SHAMMA, A.; DOKI, Y.; SHIOZAKI, H.; TSUJINAKA, T.; YAMAMOTO, M.; INOUE, M.; YANO, M.; MONDEN, M. **Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma.** *Int J Oncol*, v.16, n.2, p.261-266, 2000.

SHARIAT, S.F.; ASHFAQ, R.; SAGALOWSKY, A.I.; LOTAN, Y. **Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis.** *Hum Pathol*, v.37, p.1568-1576, 2006.

SHEEL, C.; WEINBERG, R.A. **Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links.** *Seminars in Cancer Biology*, v.22, p.396-403, 2012.

SHERR, C.J. **Mammalian G1 cyclins.** *Cell*, v.73, p.1059-1065, 1993.

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

SHERR, C.J.; ROBERTS, J. M. **Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.** *Genes Dev.* v.18, p.2699–2711, 2004.

SHIMONO, Y.; ZABALA, M.; CHO, R.W.; LOBO, N.; DALERBA, P.; QIAN, D.; *et al.* **Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells.** *Cell*, v.138, n.3, p.592-603, 2009.

SHOKER, B.S.; *et al.* **Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast.** *Am J Pathol*, v.155, p.1811-1815, 1999.

SINGH, A.; SETTLEMAN, J. **EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer.** *Oncogene*, v.29, n.34, p.4741-4751, 2010.

SLEEMAN, J.; STEEG, P.S. **Cancer metastasis as a therapeutic target.** *European Journal of Cancer*, v.46, n.7, p.1177-1180, 2010.

SMALLEY, M.; ASHWORTH, A. **Stem Cells and Breast Cancer: A Field in Transit.** *Nature Reviews Cancer*, v.3, p.832-844, 2003.

SOLOMON, D.A.; WANG, Y.; FOX, S.R.; LAMBECK, T.C.; GIESTING, S.; LAN, Z.; SENDEROWICZ, A.M.; CONTI, C.J.; KNUDSEN, E.S. **Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation.** *J Biol Chem*, v.278, n.32, p.30339-30347, 2003.

SORBY, L.A.; ANDERSEN, S.N.; BUKHOLM, I.R.; JACOBSEN, M.B. **Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer.** *J Exp Clin Cancer Res*, v.29, 2010.

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

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

SPORN, M.B. **The war on cancer.** *Lancet*, v.347, p.1377-1381, 1996.

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

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

STEUERWALD, N.; COHEN, J.; HERRERA, R.J.; BRENNER, C.A. **Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RTPCR.** *Mol Hum Reprod*, v.5, p.1034-1039, 1999.

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

SUN, F.; FU, H.; LIU, Q.; TIE, Y.; ZHU, J.; XING, R.; SUN, Z.; ZHENG, X. **Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest.** *FEBS Letters*, v.582, p.1564-1568, 2008.

TAKANO, Y.; TAKENAKA, H.; KATO, Y.; *et al.* **Cyclin D1 overexpression in invasive breast cancers: correlation with cyclin-dependent kinase 4 and oestrogen receptor overexpression, and lack of correlation with mitotic activity.** *J Cancer Res Clin Oncol*, v.125, p.505-512, 1999.

TALMADGE, J.E.; FIDLER, I.J. **AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective.** *Cancer Res*, v.70, p.5649-5669, 2010.

THIERY, J.P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R.Y.; NIETO, M.A. **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell*, v.139, n.5, p.871-890, 2009.

TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M.W. **Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.** *Nucleic Acids Res*, v.31, 2003.

TOBIN, N.P.; SIMS, A.H.; LUNDGREN, K.L.; LEHN, S.; LANDBERG, G. **Cyclin D1, Id1 and EMT in breast cancer.** *BMC Cancer*, v.11, n.417, 2011.

THOMPSON, S.L.; BAKHOUM, S.F.; COMPTON, D.A. **Mechanisms of chromosomal instability.** *Curr. Biol.*, v.20, p.285-295, 2010.

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

UMEKITA, Y.; OHI, Y.; SAGARA, Y.; YOSHIDA, H. **Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients.** *Int J Cancer*, v.98, p.415-418, 2002.

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

VAN DEN HEUVEL, S. (2005) **Cell-cycle Regulation.** NCBI, National center for biotechnology information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19719/>>. Acesso em: fevereiro de 2014.

VAN SCHOONEVELD, E.; WOUTERS, M.C.A.; VAN DER AUWERA, I.; PEETERS, D.J.; WILDIERS, H.; VAN DAM, P.A.; VERGOTE, I.; VERMEULEN, P.B.; DIRIX, L.Y.; VAN LAERE, S.J. **Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies micrnas that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers.** *Breast cancer research*, v.14, p.1-16, 2012.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. **Modelling Breast Cancer: one size does not fit all.** *Nature Reviews*, v.7, p.659-72, 2007.

VELASCO-VELÁZQUEZ, M.; JIAO, X.; DE LA FUENTE, M.; PESTELL, R.G.; ERTEL, A.; LISANTI, M.P. **CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells.** *Cancer research*, v.72, p.3839-3850, 2012.

VICENTE, J.C.; HERRERO-ZAPATERO, A.; FRESNO, M.F.; LOPEZ-ARRANZ, J.S. **Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance.** *Oral Oncol*, v.38, p.301-308, 2002.

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

WANG, T.; CARDIFF, R.; ZUKERBERG, L.; LEES, E.; ARNOLD, A.; SCHMIDT, E.V. **Mammary hyperplasia and carcinomas MMTV-cyclin D1 transgenic mice.** *Nature*, v.369, p.669-671, 1994.

WANG, J.M.; DENG, X.; GONG, W.; SU, S. **Chemokines and their role in tumor growth and metastasis.** *Journal of Immunological Methods*, v.220, p.1-17, 1998.

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

WANG, L.; HABUCHI, T.; TAKAHASHI, T.; MITSUMORI, K.; KAMOTO, T.; KAKEHI, Y.; KAKINUMA, H.; SATO, K.; NAKAMURA, A.; OGAWA, O.; KATO, T. **Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer.** *Carcinogenesis*, v.23, p.257-264, 2002.

WANG, C.; PATTABIRAMAN, N.; ZHOU, J.N.; FU, M.; SAKAMAKI, T.; ALBANESE, C.; LI, Z.; WU, K.; HULIT, J.; NEUMEISTER, P.; NOVIKOFF, P.M.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P.E.; JONES, J.G.; WHITNEY, K.D.; DONEHOWER, L.A.; HARRIS, E.L.; ROHAN, T.; JOHNS, D.C.; PESTELL, R.G. **Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor-expression and transactivation.** *Mol Cell Biol*, v.23, p.6159-6173, 2003a.

WANG, L.; HABUCHI, T.; MITSUMORI, K.; LI, Z.; KAMOTO, T.; KINOSHITA, H.; TSUCHIYA, N.; SATO, K.; OHYAMA, C.; NAKAMURA, A.; OGAWA, O.; KATO, T. **Increased risk of prostate cancer associated with AA genotype**

**of cyclin D1 gene A870G polymorphism.** *Int J Cancer*, v.103, p.116-120, 2003b.

WANG, C.; LI, Z.; LU, Y.; DU, R.; KATIYAR, S.; YANG, J.; FU, M.; LEADER, J.E.; QUONG, A.; NOVIKOFF, P.M.; PESTELL, R.G. **Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.103, p.11567-11572, 2006.

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

WEINBERG, R.A. **Tumor suppressor genes.** *Science*, v.245, p.1138-1145, 1991.

WEINBERG, R.A. **The retinoblastoma protein and cell cycle control.** *Cell*, v.81, n.3, p.323-330, 1995.

WEINBERG, R.A. **A biologia do Câncer.** PORTO ALEGRE: ARTMED, 2008.  
WELLS, A.; CHAO, Y.L.; GRAHOVAC, J.; WU, Q.; LAUFFENBURGER, D.A. **Epithelial and mesenchymal phenotypic switchings modulate cell motility in metastasis.** *Frontiers in Bioscience*, v16, p.815-837, 2011.

WEINSTEIN, I.B. **Relevance of cyclin D1 and other molecular markers to cancer chemoprevention.** *J Cell Biochem Suppl*, v.25, p.23-28, 1996.

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

WITTEW, C.T.; HERRMANN, M.G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.P. **Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.** *Biotechniques*, v.22, p.130-138, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Cancer Control Programme.** Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: setembro de 2012.

XIA, M.; SHERLOCK, J.; HEGERICH, P.; YOU, X.; LEE, K.; WALWORTH, C.; SPIER, E. **DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data.** IMECS – Hong Kong, 2010.

YANG, X.R.; SHERMAN, M.E.; RIMM, D.L.; LISSOWSKA, J.; BRINTON, L.A.; PEPLONSKA, B.; *et al.* **Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 16, p.439-443, 2007.

YIN, J.L.; SHACKEL, N.A.; ZEKRY, A.; *et al.* **Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I.** *Immunol Cell Biol*, v.79, 2001.

YU, Z.; WANG, C.; WANG, M.; LI, Z.; CASIMIRO, M.C.; LIU, M.; WU, K.; WHITTLE, J.; JU, X.; HYSLOP, T.; MCCUE, P.; PESTELL, R.G. **A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation.** *J Cell Biol.*, v.182, p.509-517, 2008.

YU, Z.; WILLMARTH, N.E.; ZHOU, J.; KATIYAR, S.; WANG, M.; LIU, Y.; MCCUE, P.A.; QUONG, A.A.; LISANTI, M.P.; PESTELL, R.G. **microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.107, p.8231-8236, 2010.

ZENG, X. *et al.* **The Ras oncogene signals centrosome amplification in mammary epithelial cells through cyclin D1/Cdk4 and Nek2.** *Oncogene*, v.29, p.5103-5112, 2010.

ZHENG, W.; DEITZ, A.C.; CAMPBELL, D.R.; WEN, W.; CERHAN, J.R.; SELLERS, T.A.; FOLSOM, A.R.; HEIN, D.W. **N-acetyltransferase 1 genetic polymorphism, cigarette smoking, well-done meat intake, and breast cancer risk.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, v.8, p.233-239, 1999.

ZHONG, Z. *et al.* **Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells.** *Cancer Res.*, v.70, p.2105-2114, 2010.

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

## DOCUMENTOS CONSULTADOS

APPLIED BIOSYSTEMS. (2010) **Protocolo TaqMan® Universal PCR Master Mix.** P/N: 4304449. Disponível em: < [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) >. Acesso em: setembro de 2013.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Manual de treinamento.** Disponível em: < [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) >. Acesso em: setembro de 2013.

## APÊNDICES

<b>I. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	102
Caracterização da amostra .....	102
Coleta e processamento .....	105
Preparação dos cortes histológicos.....	105
Análise da expressão gênica (mRNA).....	106
1. Extração do RNA total.....	106
2. Retrotranscrição .....	107
3. qPCR.....	107
3.1 Condições da reação .....	107
3.2 Sistema de detecção.....	109
3.3 Controles endógenos ( <i>housekeeping</i> ).....	110
3.4 Análise dos dados .....	110
Análise da expressão proteica .....	111
1. Imunohistoquímica .....	112
Análises estatísticas.....	112
1. Dados da expressão gênica (mRNA).....	112
2. Dados da expressão proteica.....	113
<b>II. LISTA DE CTS E SDS PARA O GENE ALVO (CCND1) E CONTROLES ENDÓGENOS (ACTB E B2M), DAS AMOSTRAS LNP</b> .....	114
<b>III. LISTA DE CTS E SDS PARA O GENE ALVO (CCND1) E CONTROLES ENDÓGENOS (ACTB E B2M), DAS AMOSTRAS LNN</b> .....	115
<b>IV. LISTA DOS VALORES DE FC DAS AMOSTRAS LNP VERSUS LNN...</b>	116
<b>V. LISTA DOS RESULTADOS OBTIDOS NA EXPRESSÃO PROTEICA PARA AS AMOSTRAS LNP VERSUS LNN</b> .....	117
<b>VI. GRÁFICOS DOS RESULTADOS</b> .....	118
<b>VII. VALIDAÇÃO DA qPCR</b> .....	122



## I. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo faz parte de uma das linhas de pesquisa desenvolvidas pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO)/ Departamento de Genética da UFPR, na área de genética do câncer de mama. Está aprovado pelo Comitê de Ética para a pesquisa em seres humanos do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba/PR, processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003.

### **Caracterização da amostra**

O estudo foi desenvolvido com amostras de tecido tumoral emblocado em parafina utilizados para o diagnóstico anatomopatológico provenientes do laboratório Citolab em colaboração com a doutoranda Fernanda Santos Cavalcanti Breginski. Com estas, constituiu-se dois grupos amostrais de carcinomas mamários esporádicos, sendo um de tumores primários com positividade para metástases em linfonodos axilares -n=19- (LNP) e o outro de tumores primários com negatividade para metástases em linfonodos axilares - n=22- (LNN).

Todas as amostras de carcinoma mamário em estudo são do subtipo Carcinoma Ductal Invasor (CDI) e, para maior homogeneidade do grupo amostral, foi feito um pareamento parcial entre as amostras dos dois grupos de tumor primário de acordo com a idade, status de expressão dos receptores de progesterona (PR) e estrogênio (ER), do oncogene *HER2* e, histologicamente, quanto ao grau de diferenciação do tumor.

As amostras de tecido tumoral parafinizado datam de 2009 a 2012 totalizando 41 amostras, provenientes de pacientes de 35 a 65 anos de idade, sendo 19 de LNP (Tabela 1) e 22 de LNN (Tabela 2).

**TABELA 1. Relação das amostras de tumor primário com positividade de metástases em linfonodos axilares (LNP) e suas respectivas características clínico-patológicas.**

<b>AMOSTRA</b>	<b>IDADE</b>	<b>HER2</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>GRAU</b>	<b>LINFONODO</b>
CA037	60	0	3	2	2	P
CA032	60	1	3	3	2	P
CA028	54	3	3	0	2	P
CA111	54	0	3	3	2	P
CA010	42	1	2	2/3	2	P
CA012	48	1	2/3	0	2	P
CA040	56	3	3	1/2	2	P
CA005	45	3	1/2	2	3	P
CA129	57	...	...	...	3	P
CA106	50	...	...	...	3	P
CA093	42	0	3	2	2	P
CA109	50	0	0	0	2	P
CA125	46	...	...	...	2	P
CA089	55	2	1	0	3	P
CA139	43	...	...	...	2	P
CA107	53	...	...	...	2	P
CA026	58	1	0	0	3	P
CA007	56	0	2	0	2	P
CA104	61	...	...	...	2	P

Informações dos 19 casos clínicos de LNP utilizados no estudo: idade das pacientes; status de expressividade dos receptores hormonais ER e PR e, do oncogene *HER2*, por intensidade de reação, com 0: negatividade de expressão, 1- fracamente positiva, 2- moderadamente positiva e 3- fortemente positiva; grau tumoral, sendo classificados de acordo com a classificação histoprognotica clássica, com 1- os bem diferenciados, 2- moderadamente diferenciados e 3- pouco diferenciados e; status de ocorrência de metástases em linfonodos axilares, com P- positividade de metástases e N- negatividade de metástases. Em negrito as amostras submetidas à análise imunohistoquímica.

**FONTE:** O autor, 2014.

**TABELA 2. Relação das amostras de tumor primário com negatividade de metástases em linfonodos axilares (LNN) e suas respectivas características clínico-patológicas.**

<b>AMOSTRA</b>	<b>IDADE</b>	<b>HER2</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>GRAU</b>	<b>LINFONODO</b>
CA023	60	1	3	2	2	N
CA011	60	1	3	3	2	N
CA091	59	3	2	0	2	N
CA039	44	0	3	3	2	N
CA101	51	3	2	2/3	3	N
CA090	51	1	3	2	2	N
CA096	42	3	3	0	2	N
CA036	48	3	1	0	3	N
CA150	56	0	0	0	3	N
CA128	48	0	0	0	3	N
CA075	61	1	2/3	2	2	N
CA041	54	3	0	0	2	N
CA100	38	1	3	3	2	N
CA118	55	3	1	0	3	N
CA113	53	0	3	2	2	N
CA030	47	0	3	2	2	N
CA115	58	0	0	0	3	N
CA019	65	0	3	1/2	1	N
CA173	38	0	1	0	3	N
CA031	35	3	1	1	3	N
CA029	65	0	0	0	3	N
CA016	41	...	...	...	2	N

Informações dos 22 casos clínicos de LNN utilizados no estudo: idade das pacientes; status de expressividade dos receptores hormonais ER e PR e, do oncogene *HER2*, por intensidade de reação, com 0: negatividade de expressão, 1- fracamente positiva, 2- moderadamente positiva e 3- fortemente positiva; grau tumoral, sendo classificados de acordo com a classificação histoprognotica clássica, com 1- os bem diferenciados, 2- moderadamente diferenciados e 3- pouco diferenciados e; status de ocorrência de metástases em linfonodos axilares, com P- positividade de metástases e N- negatividade de metástases. Em negrito as amostras submetidas à análise imunohistoquímica.

**FONTE:** O autor, 2014.

Na análise de expressão gênica através da qPCR, como calibrador foi utilizado um *pool* de cDNAs provenientes de tecido não-tumoral da mama contralateral sadia (TNCL) conservados em *RNAlater*<sup>®</sup>, preparado com as amostras CP705 NTCL, CP710 NTCL, CP712 NTCL, CP717 NTCL, CP730 NTCL, que são coletadas e processadas rotineiramente no LabCHO. Estas amostras fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética (LabCHO)/Universidade Federal do Paraná, sendo que as pacientes doadoras

do material foram convidadas a participar do estudo, firmando um termo de Consentimento Livre e Esclarecido que autoriza a coleta do material biológico.

### **Coleta e processamento**

As amostras de tumor parafinizado foram gentilmente fornecidas pelo Citolab- Laboratório de Citopatologia e Histopatologia, em Curitiba. As mesmas foram coletadas em vários hospitais e clínicas da região de Curitiba-PR, pelos médicos patologistas do Citolab para processamento e confecção de blocos histológicos e lâminas. De acordo com as amostras disponíveis no banco de dados e blocário do Citolab, foram separados os blocos histológicos de parafina e seus respectivos laudos. Todo o procedimento metodológico foi desenvolvido com a efetiva colaboração da doutoranda deste curso e pertencente ao grupo do laboratório acima referido, Fernanda Santos Cavalcanti Breginski, sob a supervisão da Professora Dra. Enilze Maria S. F. Ribeiro.

O tecido não-tumoral da mama contralateral (TNCL), utilizado como calibrador na análise da expressão gênica, foi obtido da mama contralateral sadia de pacientes com câncer, submetidas a mastectomia no Hospital Nossa Senhora das Graças em Curitiba, durante o procedimento cirúrgico e de reconstrução estética. Na obtenção, o material foi acondicionado em tubo Falcon estéril contendo um estabilizador de RNA, o *RNAlater*<sup>®</sup> (Applied Biosystems), a fim de garantir a preservação do RNA até o momento de sua extração. Imediatamente encaminhadas ao LabCHO, estas amostras foram processadas manualmente no fluxo laminar em placas de petri descartáveis à temperatura ambiente. Neste processamento, utilizou-se tesouras e pinças esterilizadas para remoção dos tecidos adjacentes a massa celular desejada, como gordura, estroma e vasos sanguíneos. Em seguida, o material foi estocado em microtubos e mantido à -80°C até a extração do RNA total.

### **Preparação dos cortes histológicos**

Para as amostras de tumor parafinizado, após a seleção dos casos e blocos do banco de dados do laboratório Citolab, foi realizada microtomia de todos os blocos de parafina para obtenção dos cortes histológicos de 5µm para os experimentos de análise da expressão gênica (qPCR), e de 3µm à 4µm para

a análise da expressão proteica (IHQ), dispostos em lâminas sinalizadas para cada um dos blocos histológicos de parafina.

### **Análise da expressão gênica (mRNA)**

A análise da expressão gênica foi realizada através da PCR quantitativa em tempo real, após conversão do mRNA em cDNA pela retrotranscrição (RT-PCR *two-step*).

Na análise da expressão gênica um *n* de 18 amostras de LNP e um *n* de 21 amostras de LNN foram analisadas (os Apêndice IV possui uma relação com as 39 amostras utilizadas na qPCR).

#### **1. Extração do RNA total**

A extração do RNA total das amostras de tecido tumoral parafinizado foi realizada com o kit comercial *High Pure RNA Paraffin kit* (Roche), com protocolo adaptado e padronizado no laboratório. As etapas que se seguiram para obtenção do RNA contam com a desparafinização seguida da digestão com protease, para subsequente isolamento do ácido nucléico e obtenção do RNA purificado. O método de desparafinização adotado, contou com sucessivos banhos em xylol 100%, para promover a desparafinização, seguidos de banhos em etanol absoluto, para limpeza do xylol. Na etapa da digestão protease, o *pellet* liberado da parafina foi incubado *overnight* à 55°C com tratamento de proteinase-K. O isolamento do RNA purificado foi realizado com o método de filtro com tratamento de nuclease, tendo a precipitação realizada com etanol absoluto, seguida da limpeza com etanol 70% e digestão nuclease com *DNase I*.

Para realizar a extração do RNA total em amostras de tecido não-tumoral em *RNAlater*<sup>®</sup>, seguiu-se o protocolo adaptado no mesmo laboratório utilizando o kit comercial *RNeasy*<sup>®</sup> *kit* (QIAGEN). Em ambos os protocolos, realizou-se o tratamento com a nuclease *DNase I*. Na extração do material parafinizado o kit utilizado já continha *DNase I*, enquanto que para a extração do tecido não-tumoral o kit utilizado necessitou o uso adicional do kit *RNase-Free-DNase* (QIAGEN), garantindo assim a qualidade do material extraído. Subsequentemente estocou-se o RNA total extraído, de ambas amostras, à -80°C.

As concentrações e os parâmetros de contaminação e pureza de cada amostra foram mensurados através do espectrofotômetro *Nanodrop®2000* (*Thermo Fischer Scientific Inc.*), e a partir do equipamento *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*), pôde-se realizar a verificação da integridade da molécula de RNA.

A partir dos RNAs extraídos, foram preparadas soluções de trabalho contendo 30 ng/ $\mu$ L para as reações de retrotranscrição.

## 2. Retrotranscrição

Foram realizadas reações de retrotranscrição do tipo *two-step*, em equipamento de PCR convencional utilizando *primers* randômicos, sendo que a quantidade de 300ng de RNA foi utilizada como *template* inicial para a síntese de cDNA, com o auxílio do kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (*Roche*). Para melhor qualidade do material obtido, a reação contou com inibidor de RNase.

Reações de retrotranscrição negativa (RT-) foram realizadas para averiguação da qualidade do RNA extraído, quanto a contaminação de DNA genômico (gDNA), para as amostras de tecido tumoral parafinizado e amostras de tecido não-tumoral em *RNAlater®*.

## 3. qPCR

### 3.1 Condições da reação

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) utilizando o sistema de detecção por sonda de hidrólise fluorescente *TaqMan® FAM™-MGB* (com QNF). As reações na placa de qPCR seguiram o protocolo *TaqMan® Gene Expression Assays* utilizando o mix comercial de PCR com atividade *AmpErase® UNG* que previne reamplificação, *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), permitindo corrida de modo *standard*.

O Master Mix utilizado apresenta o corante *ROX™* como referência passiva que normaliza as flutuações na intensidade da emissão de fluorescência do corante *reporter FAM™*, gerando um valor de intensidade de fluorescência normalizado  $\Delta Rn$ .

O volume final das reações no ensaio de expressão foi de 10  $\mu\text{L}$ , com a proporção dos reagentes como indicado pelo protocolo *TaqMan® Gene Expression Assays* e quantidade de *template* inicial de 30ng de cDNA (Quadro 1):

**QUADRO 1. Reagentes utilizados nas reações dos ensaios de expressão gênica (mRNA)**

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
<b><i>TaqMan® Universal PCR MasterMix</i></b>	2x	5 $\mu\text{L}$
<b>Água miliQ autoclavada</b>	-	2,5 $\mu\text{L}$
<b><i>Assay TaqMan® Gene Expression</i></b>	20x	0,5 $\mu\text{L}$
<b>cDNA</b>	15ng/ $\mu\text{L}$	2,0 $\mu\text{L}$

Reagentes e suas respectivas, concentrações e volumes, utilizados nas reações dos ensaios de expressão gênica (mRNA).

**FONTE:** O autor, 2014.

O programa de ciclagem seguiu as condições indicadas pela Applied Biosystems como ilustrado no Quadro 2:

**QUADRO 2. Programa de ciclagem das reações dos ensaios de expressão gênica (mRNA)**

		TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS	ATIVIDADE
<b>Condição Inicial</b>	Etapa 1	50°C	2min	-	Ativação AmpErase®UNG
	Etapa 2	95°C	10min	-	Ativação da Taq®DNA polimerase
<b>Condição de Ciclagem</b>	Etapa 1	95°C	15s	40	Desnaturação
	Etapa 2	60°C	1min	40	Hibridização e Extensão

Temperatura, tempo de incubação, número de ciclos e atividade desempenhada em cada condição de ciclagem estabelecida.

**FONTE:** O autor, 2014.

### 3.2 Sistema de detecção

O sistema de detecção adotado foi a utilização de sondas fluorescentes adquiridas como ensaios comerciais patenteados pela *Life Technologies*<sup>TM</sup>, *TaqMan*<sup>®</sup>*Gene Expression Assays*, que contém o par de *primers*, *foward* e *reverse*, e a sonda fluorescente *TaqMan*<sup>®</sup>*MGB* em concentração uso (20x). Estes são específicos por gene e dispensam curva padrão para otimização dos ensaios de expressão, pois garantem 100% de eficiência nas reações, desde que nas condições aqui adotadas.

A escolha dos ID *TaqMan*<sup>®</sup>*Gene Expression Assays - Assay on-demand* deu-se por sua construção em regiões de junções de exons, garantindo a especificidade na análise do mRNA, sendo o mais indicado pela *Life Technologies*<sup>TM</sup> para análise da expressão gênica (Tabela 3). Neste ensaio, a seleção específica dos *primers*, desenhados entre os exons 3 e 4, amplifica indiferencialmente mRNA de ambas as isoformas da Ciclina D1 (D1a e D1b).

TABELA 3. IDs dos ensaios *TaqMan*<sup>®</sup>*Gene Expression Assays -Assay on-demand*

Nome	Sigla	Assays ID	Tamanho do <i>amplicon</i> (em pb)	Limite-éxons
Ciclina D1	CCND1	Hs00765553_m1	57	3-4
$\beta$ -actina	ACTB	Hs01060665_g1	63	2-3
$\beta$ -2-microglobulina	B2M	Hs00984230_m1	81	3-4

Informações de referência dos assays *TaqMan*<sup>®</sup> (Applied Biosystems): sigla de referência no banco de dados, ID dos ensaios comerciais *TaqMan*<sup>®</sup>, tamanho do *amplicon* e limite entre exons usado no desenho dos *primers*, *foward* e *reverse*, e sonda *TaqMan*<sup>®</sup>*MGB*.

FONTE: O autor, 2014.

Os ensaios de expressão contam com NTCs como controles negativos, além das reações de amplificação do gene alvo e controles endógenos para as amostras, calibrador e controle positivo de reação (C+). Os dados de amplificação foram analisados através do *StepOne*<sup>TM</sup> *software* v2.3 (Applied Biosystems).

Um *pool* de cDNA proveniente de 5 amostras de tecido não-tumoral da mama contralateral em RNAlater<sup>®</sup> foi utilizado como o calibrador.



### 3.3 Controles endógenos (*housekeeping*)

Segundo Sorby e colaboradores (2010), é importante validar os controles endógenos (*housekeeping*) em cada sistema experimental, a fim de aumentar a confiabilidade nas diferenças de expressão que são detectadas. Por isso, os controles endógenos  $\beta$ -actina (*ACTB*) e  $\beta$ -2-microglobulina (*B2M*), utilizados no presente estudo, foram selecionados em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa através de um experimento teste com cartão microfluídico *TaqMan® Low Density Endogenous Control Panel* (TLDA – *TaqMan® Low Density 38 Array*) (Applied Biosystems). O referido cartão continha ensaios para 16 genes de referência mais comumente utilizados, candidatos a controles endógenos, cuja expressão é constitutiva. Para realização destas reações utilizou-se o mix de PCR *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), sendo a leitura realizada no aparelho *ABI Prism 7900HT Fast Real time PCR System* (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados através do *DataAssist™ v3.0 Software* (Applied Biosystems) que gera um *score* de estabilidade para cada gene candidato baseado nos valores de desvio padrão. Os genes mais estáveis foram os que apresentaram os menores *scores*. Dentre os 16 genes mais comumente utilizados, os que apresentaram expressão estável em amostras de tecido mamário não-tumoral e tumoral foram os genes ***B2M***, ***PPIA***, ***IPO8*** e ***ACTB*** (OLIVEIRA, 2013).

### 3.4 Análise dos dados

Os dados foram analisados para uma quantificação relativa, onde a expressão gênica de um determinado gene alvo é estabelecida em relação a uma amostra de referência (CALIBRADOR), sendo normalizada quanto às variáveis experimentais, como quantidade de *template* inicial, pelos controles endógenos. O método adotado para a análise foi o do Ct comparativo ou Método do  $\Delta\Delta Ct$ , cuja fórmula aritmética para interpolação dos dados é  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; XIA *et al.*, 2010). Com este método, a comparação foi realizada entre a variação do Ct (*cycle threshold*) das amostras dos dois grupos amostrais de tumor (LNP e LNN) em relação a um mesmo calibrador (*pool* de amostras TNCL).

A quantificação relativa foi calculada através das fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}}$$

$$\Delta Ct_{TUMOR} = Ct_{\text{gene alvo}_{(TUMOR)}} - Ct_{\text{controle endógeno}_{(TUMOR)}}$$

$$\Delta Ct_{CALIBRADOR} = Ct_{\text{gene alvo}_{(CALIBRADOR)}} - Ct_{\text{controle endógeno}_{(CALIBRADOR)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{TUMOR} - \Delta Ct_{CALIBRADOR}$$

A expressão do gene alvo na amostra em relação ao calibrador, conhecido como valor de *Fold Change* (FC) foi obtida pela fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Este valor de FC, dado individualmente por amostra, representa a diferença da expressão, ou seja, a expressão relativa do gene de interesse em relação ao calibrador.

Os dados de expressão gênica relativa foram obtidos e analisados através do *StepOne™ software v2.3* (Applied Biosystems).

Quanto aos parâmetros para aceitação dos dados: Um intervalo limite de aceitação para os valores de Ct foi estipulado inicialmente:  $14 < Ct < 35$ . Um limite de 20% para os desvios padrão (SD) das triplicatas técnicas foi estabelecido. Deste modo, apenas amostras com valores de Cts entre 14 e 35 com  $SD < 0,2$  foram incluídas na análise. Os valores de Ct e seus respectivos SDs das amostras tumorais LNP e LNN, que foram utilizadas na análise da expressão gênica, são mostrados nos Apêndices II e III, respectivamente; e os valores de FC, no apêndice IV.

### **Análise da expressão proteica**

A análise proteica através da metodologia de imunohistoquímica (IHQ) foi feita para validar os resultados obtidos por qPCR. A avaliação da expressão dos genes de interesse a nível de proteína complementa os dados obtidos sobre o status do mRNA por qPCR.

Na análise da expressão proteica um  $n$  de 10 amostras de LNP e um  $n$  de 10 amostras de LNN foram analisadas (o Apêndice V possui uma relação com as 20 amostras selecionadas para IHQ).

## **1. Imunohistoquímica (IHQ)**

Esta etapa do trabalho foi realizada com a efetiva colaboração do laboratório Citolab, tendo sido a leitura das lâminas de IHQ realizada pelos médicos patologistas pertencentes ao mesmo.

A técnica utiliza anticorpos monoclonais específicos para cada marcador, além de controles internos e um controle específico para o anticorpo do gene em questão, o anti-ciclina D1. Os anticorpos primários foram diluídos para sua utilização.

As lâminas foram primeiramente desparafinizadas através de banhos em xylol, etanol 100%, etanol 70% e água destilada. Após a desparafinização, foi feita a recuperação antigênica e subsequentemente o bloqueio da peroxidase. Em seguida, fez-se as diluições do anticorpo primário anti-ciclina D1.

Na sequência, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário, sendo submetidas, em seguida, à coloração com cromógeno diaminobenzidina (DAB) e contra-coradas com hematoxilina.

As lâminas foram analisadas pelos profissionais patologistas do laboratório Citolab, através de microscopia comum, baseando-se em estimativas de porcentagem de células positivas e intensidade de imunocoloração, representadas em termos numéricos: (-) amostras não coradas/não reatoras - 0; (+) amostras com menos de 25% de tecido cancerígeno corado e/ou fracamente reator - 1; (++) amostras com 25-50% de tecido cancerígeno corado e/ou moderadamente reator - 2; e (+++) amostras com mais de 50% de tecido cancerígeno corado e/ou fortemente reator - 3.

É importante ressaltar que na análise por IHQ, em tecidos humanos normais, a expressão de Ciclina D1 é bem baixa ou negativa (BARTKOVA *et al.*, 1994).

## **Análises estatísticas**

### **1. Dados da expressão gênica (mRNA)**

Como na análise dos dados, utilizou-se o Método do Ct comparativo (XIA *et al.*, 2010) que gerou valores de FC para cada amostra em relação ao calibrador, revelando a quantificação relativa do gene *CCND1*, estes valores de FC foram utilizados nas análises estatísticas.

Para a avaliação da significância nas diferenças entre os valores de FC de *CCND1* entre os dois grupos amostrais em estudo, utilizou-se o *software GraphPad Prism v6.01* para *Windows* (Disponível em: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Inicialmente, verificou-se a distribuição dos dados, através do teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Para dados paramétricos, que apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de *Student* com correção de *Welch*, para avaliar a significância das diferenças apresentadas entre os dois grupos amostrais de interesse; em casos de dados não-paramétricos, que não apresentaram distribuição normal, o teste de *Mann-Whitney*, foi aplicado.

Os testes utilizaram um nível de confiança de 95%, considerando o nível de significância em 5%.

Para avaliar as alterações dos níveis de expressão gênica de *CCND1* em função dos parâmetros clinicopatológico das pacientes, incluindo dados do acompanhamento clínico, os mesmos testes estatísticos aplicados aos grupos de LNP x LNN foram aplicados aos grupos: *HER2+* x *HER2-*, *ER+* x *ER-*, *PR+* x *PR-*, *GRAUS I e II* x *GRAU III*, *PRÉ-MENOPAUSA* (idade  $\leq$  50anos) x *PÓS-MENOPAUSA* (idade  $>$  50anos).

O teste  $\chi^2$  com nível de confiança de 95% foi realizado para verificar a homogeneidade dos controles endógenos: *ACTB* e *B2M*.

## **2. Dados da expressão proteica**

Para avaliar a significância nas diferenças entre resultados positivos e negativos da análise da expressão proteica apresentados nos dois grupos de tumores em estudo, LNP x LNN, o teste  $\chi^2$  com nível de confiança de 95% foi empregado, a fim de verificar se havia homogeneidade ou diferença significativa entre os grupos.

**APÊNDICE II. LISTA DE C<sub>T</sub>S E SDs PARA O GENE ALVO (CCND1) E CONTROLES ENDÓGENOS (ACTB E B2M), DAS AMOSTRAS LNP**

Amostra	ACTB		B2M		CCND1	
	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> SD	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> SD	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> SD
CA032	26,46854	0,039186	29,35325	0,039408	29,92493	0,059139
CA089	25,6117	0,035207	26,58662	0,046927	29,33759	0,00653
CA040	25,25559	0,059581	26,7706	0,034854	28,40456	0,072394
CA107	26,015	0,033496	29,4945	0,09307	28,46463	0,067519
CA104	27,42936	0,017605	29,85488	0,041632	26,79862	0,018008
CA037	27,00935	0,056264	29,62347	0,038762	28,78283	0,113942
CA111	27,981	0,15178	29,12231	0,07984	29,44661	0,031539
CA109	26,69813	0,05454	30,62804	0,170037	30,35333	0,064635
CA005	25,88983	0,110444	28,70535	0,046514	29,2109	0,056231
CA028	25,65518	0,008338	28,55111	0,073296	29,24344	0,021415
CA010	26,46361	0,01297	29,7014	0,022455	29,89428	0,095125
CA007	25,90333	0,013132	32,85135	0,117987	30,36762	0,080906
CA026	23,31005	0,030342	28,85769	0,028113	30,64871	0,071836
CA106	26,95831	0,028255	29,85779	0,007381	30,95591	0,007971
CA093	26,10658	0,188114	28,39672	0,112642	28,76901	0,063431
CA139	27,56783	0,051824	31,51032	0,078246	31,29486	0,12066
CA129	28,56079	0,028749	30,55967	0,036688	32,65608	0,045656
CA012	24,3675	0,038832	28,6847	0,047447	29,08072	0,054491
CA125	25,77613	0,065626	27,88194	0,052444	30,91234	0,016153

Valores de C<sub>T</sub> e seus respectivos SD por amostra, para as 19 amostras de LNP, para ambos os controles endógenos, ACTB e B2M, e gene alvo CCND1. Os dados foram obtidos através do software StepOne™ v2.3.

C<sub>T</sub>: cycle threshold

SD: desvio padrão

**FONTE:** O autor, 2014.

**APÊNDICE III. LISTA DE C<sub>T</sub>s E SDs PARA O GENE ALVO (CCND1) E CONTROLES ENDÓGENOS (ACTB E B2M), DAS AMOSTRAS LNN**

Amostra	ACTB		B2M		CCND1	
	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> SD	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> SD	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> SD
CA075	27,83282	0,004324	30,12737	0,035401	33,98189	0,102153
CA029	25,66674	0,028143	27,06421	0,010849	28,85882	0,043768
CA019	29,28304	0,004866	31,15052	0,071411	31,30042	0,048702
CA113	28,05514	0,067546	30,17888	0,029035	29,50685	0,06153
CA011	25,11351	0,194728	28,02744	0,014888	28,37491	0,04697
CA039	29,8286	0,19696	31,06058	0,104736	32,8946	0,091857
CA036	28,12623	0,013386	31,19963	0,066253	32,16754	0,014188
CA031	27,11666	0,120284	32,00021	0,044096	33,0582	0,079026
CA100	23,35726	0,127115	28,39719	0,071546	28,57833	0,039147
CA030	24,52065	0,02506	28,9565	0,058528	28,15186	0,029238
CA041	23,11546	0,192124	29,56408	0,169683	30,3696	0,025597
CA101	23,85486	0,097516	27,35379	0,0659	30,15249	0,143449
CA016	26,2006	0,015792	29,70004	0,047068	28,14369	0,046894
CA091	26,13299	0,058238	27,64048	0,018194	28,90216	0,08355
CA150	25,92668	0,198453	32,31512	0,156473	32,30783	0,125283
CA128	28,65942	0,011148	30,90445	0,085563	28,88364	0,025538
CA023	26,85495	0,03556	28,50143	0,057019	29,86433	0,034285
CA173	28,0827	0,023644	30,32012	0,058542	28,77325	0,168378
CA115	29,15474	0,045965	34,3168	0,086644	34,24075	0,129928
CA090	28,98436	0,044913	29,35403	0,06178	30,04294	0,144686
CA096	26,57765	0,157726	30,13512	0,056947	29,91758	0,107178
CA118	27,32205	0,080296	32,48071	0,021512	31,07248	0,06231

Valores de C<sub>T</sub> e seus respectivos SD por amostra, para as 22 amostras de LNN, para ambos os controles endógenos, ACTB e B2M, e gene alvo CCND1. Os dados foram obtidos através do software StepOne™ v2.3.

C<sub>T</sub>: *cycle threshold*

SD: desvio padrão

**FONTE:** O autor, 2014.

## APÊNDICE IV. LISTA DOS VALORES DE FC DAS AMOSTRAS LNP VERSUS LNN

LNP	FC	LNN	FC
CA032	1,43558526	CA075	0,148178905
CA089	0,470179349	CA029	0,843146563
CA040	1,005033135	CA019	0,749859631
CA107	3,694223166	CA113	1,212925434
CA037	1,150217056	CA011	0,924894869
CA111	0,854631841	CA039	0,591228426
CA109	0,492463201	CA036	0,569270909
CA005	1,042491674	CA031	0,285590708
CA028	0,895703554	CA100	1,318937063
CA010	1,151724339	CA030	4,379516125
CA007	4,317492962	CA041	0,525091171
CA026	0,532331288	CA101	0,287654996
CA106	1,336243391	CA091	2,145577431
CA093	2,729577303	CA150	0,254463315
CA139	2,313782454	CA128	4,31915617
CA129	1,049767971	CA023	0,509208143
CA012	0,828549769	CA173	3,641083002
CA125	0,287169504	CA115	0,583857656
		CA090	2,656502691
		CA096	1,649557646
		CA118	3,090932736

Valores de FC por amostra, para as 19 amostras de LNP e 22 amostras de LNN. A média geral dos valores de FC de todas as amostras tumorais é de  $1,44 \pm 1,24$ . A média dos valores de FC das amostras LNP é de  $1,42 \pm 1,12$ . A média dos valores de FC das amostras LNN é de  $1,46 \pm 1,37$ . Os dados foram obtidos na análise dos dados da qPCR através do *software StepOne™ v2.3*.

FC: *Fold Change*.

**FONTE:** O autor, 2014.

**APÊNDICE V. LISTA DOS RESULTADOS OBTIDOS NA EXPRESSÃO PROTEICA PARA AS AMOSTRAS LNP VERSUS LNN**

<i>LNP</i>	<i>IHQ</i>	<i>LNN</i>	<i>IHQ</i>
CA032	+	CA075	-
CA040	++	CA029	-
CA104*	+++	CA113	++
CA089	++	CA019	+++
CA107	++	CA030	++
CA111	++	CA016*	+++
CA109	+	CA100	++
CA037	+	CA101	++
CA010	+	CA091	++
CA005	+ / +++	CA031	++

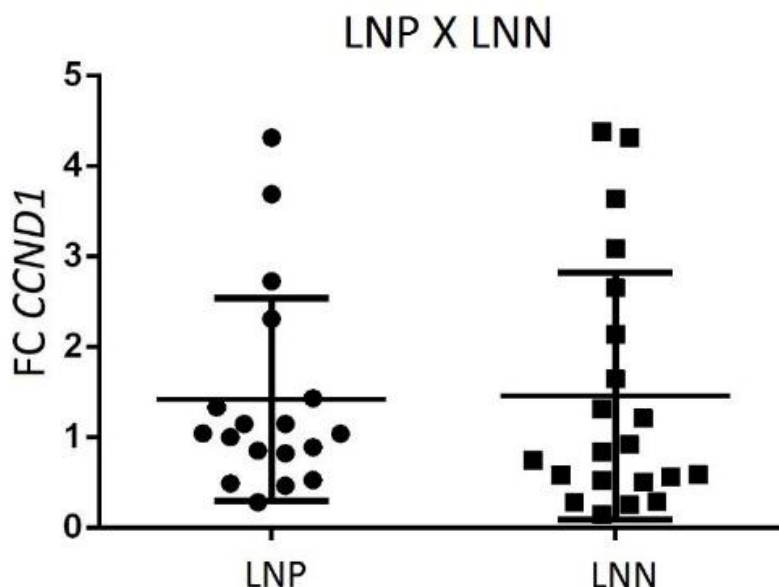
Resultado qualitativo de positividade da proteína Ciclina D1 na IHQ, classificado por intensidade de fluorescência, com - para amostras não-reagentes, + para amostras pouco reagentes, ++ moderadamente reagentes, +++ fortemente reagentes. Os dados foram obtidos na análise da lâmina de IHQ por patologistas.

\*Amostras não incluídas na análise da expressão gênica (mRNA)

**FONTE:** O autor, 2014.



## APÊNDICE VI. GRÁFICOS DOS RESULTADOS

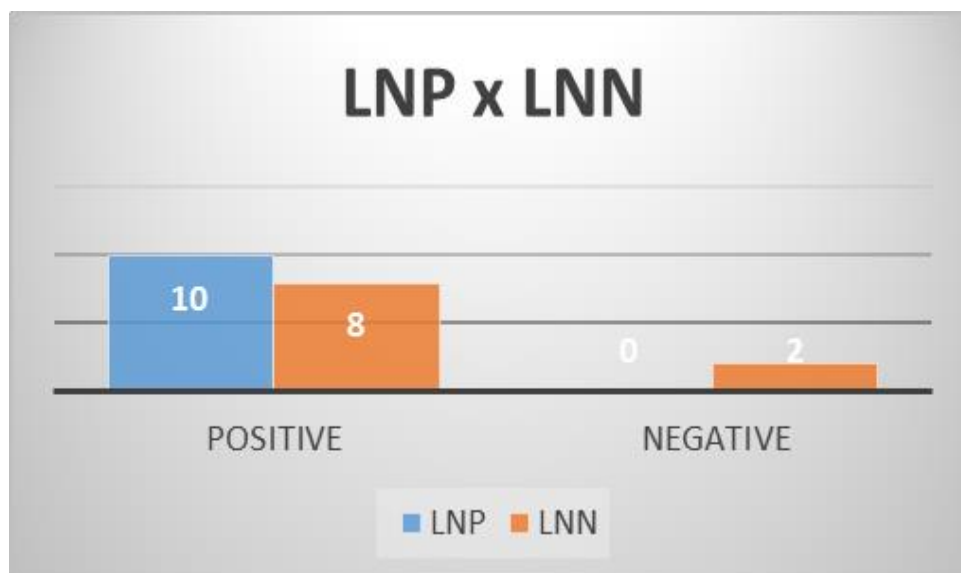


**FIGURA 1.** Gráfico de dispersão dos valores de expressão gênica relativa de *CCND1* em amostras LNP versus LNN. Resultado comparativo entre os grupos amostrais de tumor primário com positividade para metástase em linfonodos axilares (LNP) e as que apresentaram negatividade (LNN), demonstrando os valores de FC por amostra. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *GraphPad Prism v6.01*.

Média (LNP):  $1,42 \pm 1,12$ .

Média (LNN):  $1,46 \pm 1,37$ .

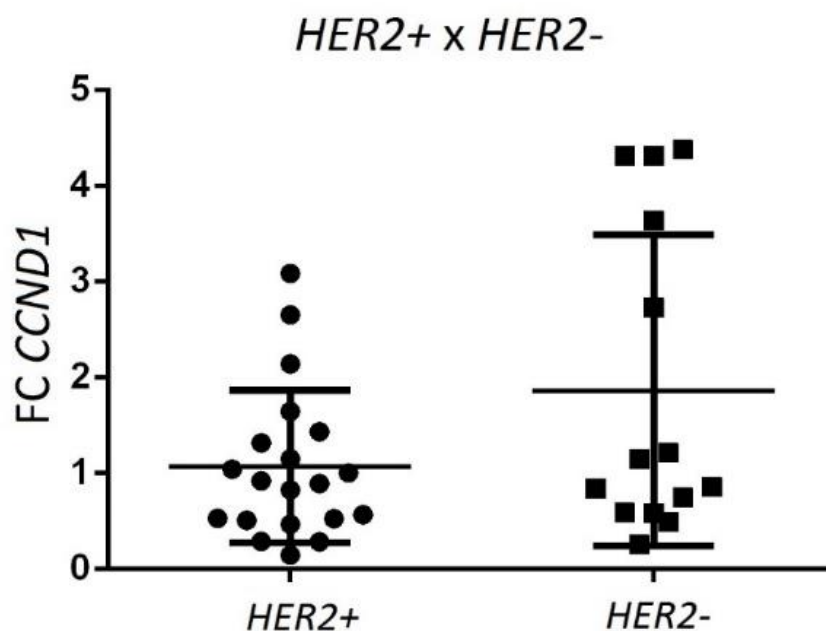
**FONTE:** O autor, 2014.



**FIGURA 2.** Gráfico em barras da variação da expressão proteica de *CCND1* em amostras de LNP versus LNN. Em azul LNP e em alaranjado LNN. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *Office Excel v2013*.

**LEGENDA:** LNP, amostras com positividade para metástase em linfonodo; LNN, amostras com negatividade para metástase em linfonodo.

**FONTE:** O autor, 2014.

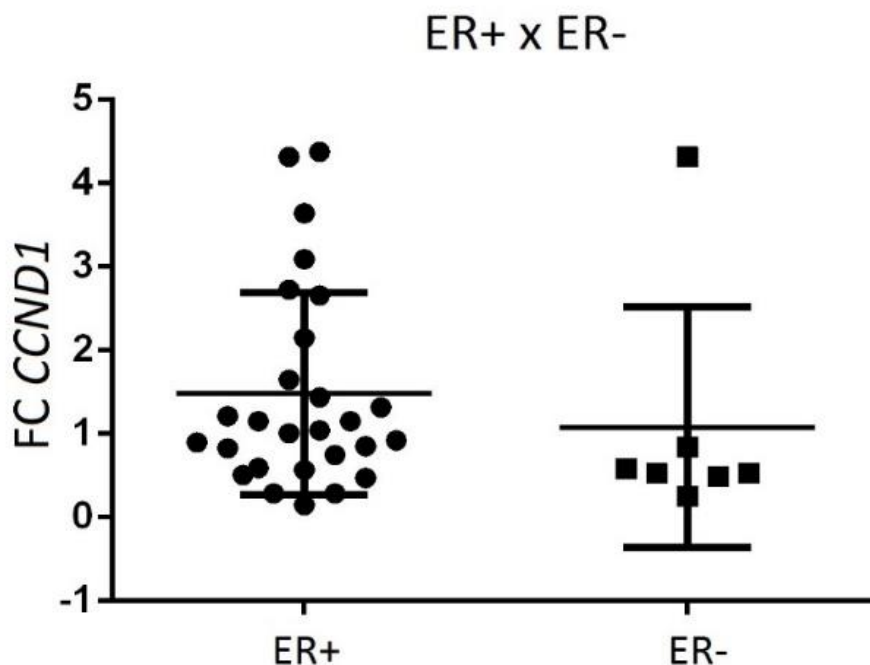


**FIGURA 3.** Gráfico de dispersão dos valores da expressão gênica relativa de *CCND1* em amostras *HER2+* versus *HER2-*. Resultado comparativo entre os grupos de tumores *HER2+* e *HER2-*, demonstrando os valores de FC por amostra. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *GraphPad Prism v6.01*.

Média (*HER2+*):  $1,07 \pm 0,79$ .

Média (*HER2-*):  $1,87 \pm 1,62$ .

**FONTE:** O autor, 2014.

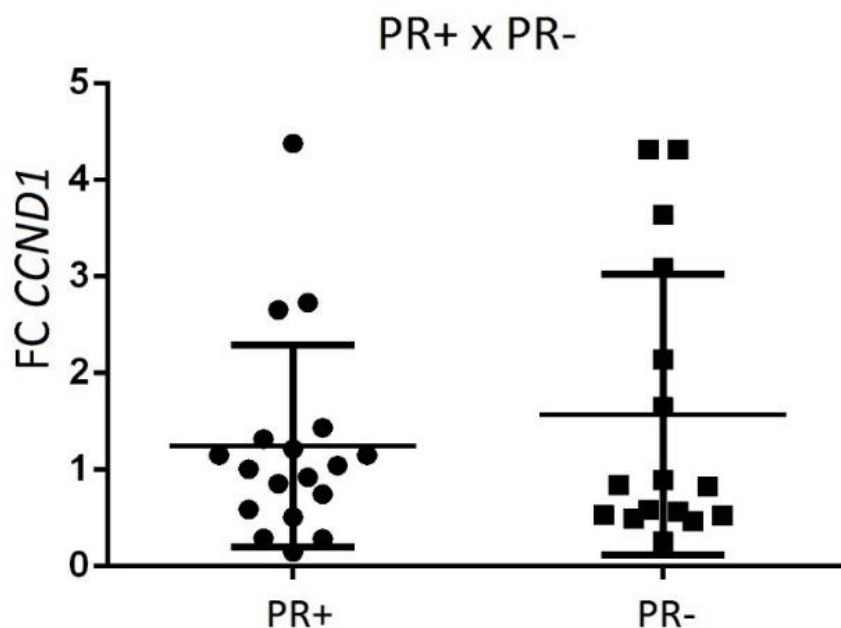


**FIGURA 4.** Gráfico de dispersão dos valores da expressão gênica relativa de *CCND1* em amostras *ER+* versus *ER-*. Resultado comparativo entre os grupos de tumores *ER+* e *ER-*, demonstrando os valores de FC por amostra. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *GraphPad Prism v6.01*.

Mean (*ER+*):  $1,48 \pm 1,21$ .

Mean (*ER-*):  $1,08 \pm 1,44$ .

**FONTE:** O autor, 2014.

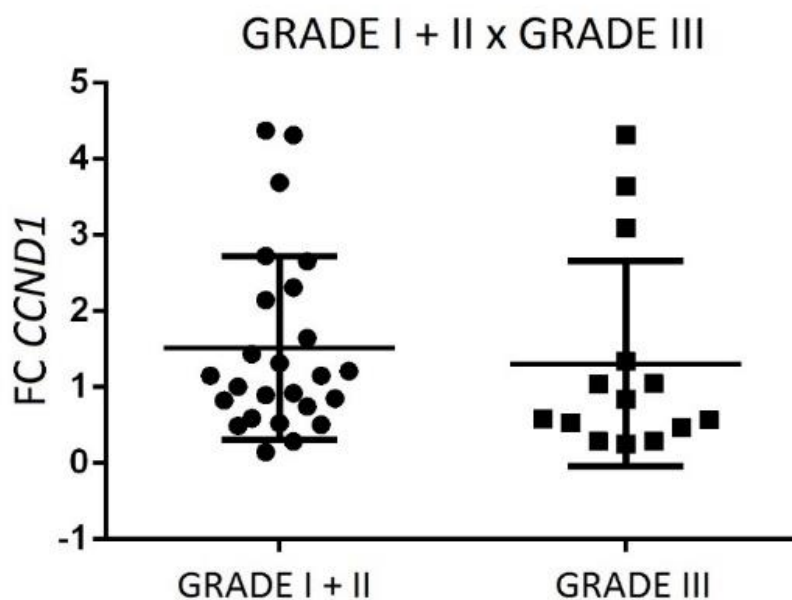


**FIGURA 5.** Gráfico de dispersão dos valores da expressão gênica relativa de *CCND1* em amostras PR+ versus PR-. Resultado comparativo entre os grupos de tumores PR+ e PR-, demonstrando os valores de FC por amostra. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *GraphPad Prism v6.01*.

Média (PR+):  $1,25 \pm 1,05$ .

Média (PR-):  $1,57 \pm 1,46$ .

FONTE: O autor, 2014.

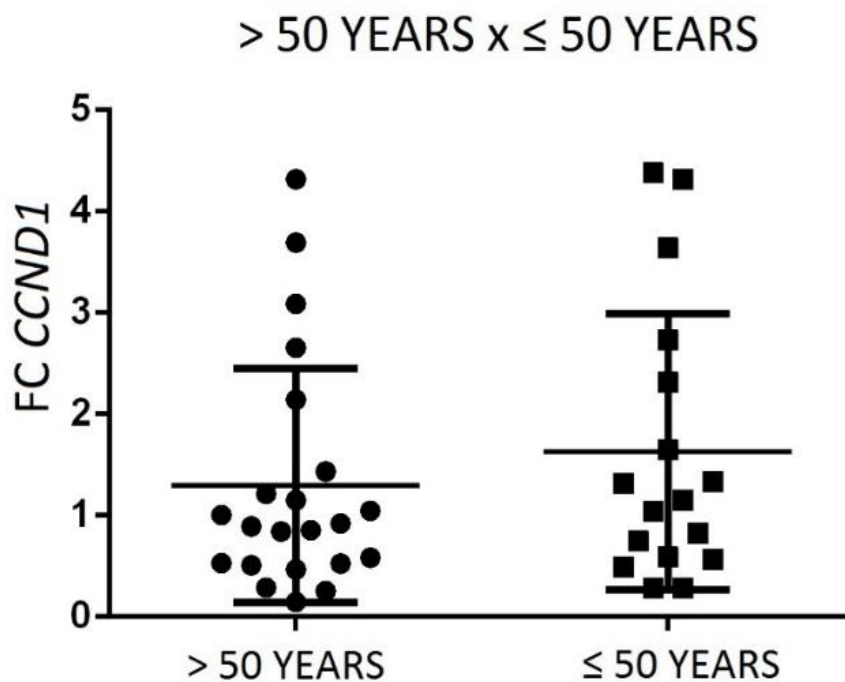


**FIGURA 6.** Gráfico de dispersão dos valores da expressão gênica relativa de *CCND1* em amostras de GRAUS I + II versus GRAU III. Resultado comparativo entre os grupos de tumores com graus tumoral I/II e grau III, demonstrando os valores de FC por amostra. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *GraphPad Prism v6.01*.

Mean (I + II):  $1,52 \pm 1,20$ .

Mean (III):  $1,31 \pm 1,35$ .

FONTE: O autor, 2014.



**FIGURA 7.** Gráfico de dispersão dos valores da expressão gênica relativa de *CCND1* em amostras de pacientes >50 anos e ≤50 anos. Resultado comparativo entre os grupos de amostras com pacientes que apresentavam mais de 50 anos (>50) e as que apresentavam 50 anos ou menos (≤50), subdividindo-as em grupos de pós e pré-menopausa, respectivamente. Os valores de FC é ilustrado por amostra. Gráfico obtido na análise estatística, através do software *GraphPad Prism v6.01*.

Média (>50):  $1,30 \pm 1,15$ .

Média (≤50):  $1,63 \pm 1,36$ .

**FONTE:** O autor, 2014.

## APÊNDICE VII. VALIDAÇÃO DA qPCR

Como é amplamente conhecido, a extração dos ácidos nucleicos de tecidos emblocados em parafina apresenta dificuldades [1-7], quando comparada à extração de tecidos não-parafinizados, decorrentes da quantidade e qualidade do RNA obtido. Sendo assim, testes de padronização foram realizados até se obter reações de retrotranscrição e qPCR otimizadas.

Embora o material obtido apresentasse parcial degradação, com valores RIN inferiores a 7, reações de qPCR otimizadas com sistema de detecção altamente sensível e específico para amplificação de *amplicons* curtos (menores que 100pb), resultaram em ótimas curvas de amplificação, com Cts entre 23 e 34 e SD, entre as triplicatas técnicas, menores que 20% (Apêndice II e III). As eficiências obtidas foram de 100% para ambos os ensaios de expressão do gene alvo *CCND1* e controles endógenos (*ACTB* e *B2M*) através do uso de ensaios comerciais *TaqMan*<sup>®</sup>.

Quanto ao parâmetro de pureza avaliado, reações testes de RT-revelaram a pureza do RNA obtido quanto a presença de gDNA contaminante. Os testes realizados garantem confiabilidade aos dados obtidos.

### Referências:

- [1]CHAW, Y.F.; CRANE, L.E.; LANGE, P.; SHAPIRO, R. **Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids**. *Biochemistry*, v.24, p.5525-5531, 1980.
- [2]LEWIS, F.; MAUGHAN, N.J.; SMITH, V.; HILLAN, K.; QUIRKE, P. **Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue**. *J Pathol*, v.1, p.66-71, 2001.
- [3]LI, J.; SMYTH, P.; CAHILL, S.; DENNING, K.; FLAVIN, R.; AHERNE, S.; PIROTTA, M.; GUENTHER, S.M.; O'LEARY, J.J.; SHEILS, O. **Improved RNA quality and TaqMan<sup>®</sup> Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalina fixed paraffin embedded (FFPE) materials**. *BMC Mol Biol*, v.8, 2008.
- [4]OPITZ, L.; SALINAS-RIESTER, G.; GRADE, M.; JUNG, K.; JO, P.; EMONS, G.; GHADIMI, B.M.; BEIBARTH, T.; GAEDCKE, J. **Impacto f RA degradation on gene expression**. *Profiling BMC Medical Genomics*, v.3, 2010.
- [5]POPOVA, T.; MENNERICH, D.; WEITH, A.; QUAST, K. **Effect of RNA quality on transcript intensity levels in microarray analysis of human post-mortem brain tissues**. *BMC Genomics*, v.9, 2008.
- [6]SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. **Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids**. *Am J Pathol*, v.6, p.1961-1971, 2002.
- [7]STRAND, C.; ENELL, J.; HEDENFALK, I.; FERNÖ, M. **RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis-a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces**. *BMC Mol Biol*, v.8, 2007.