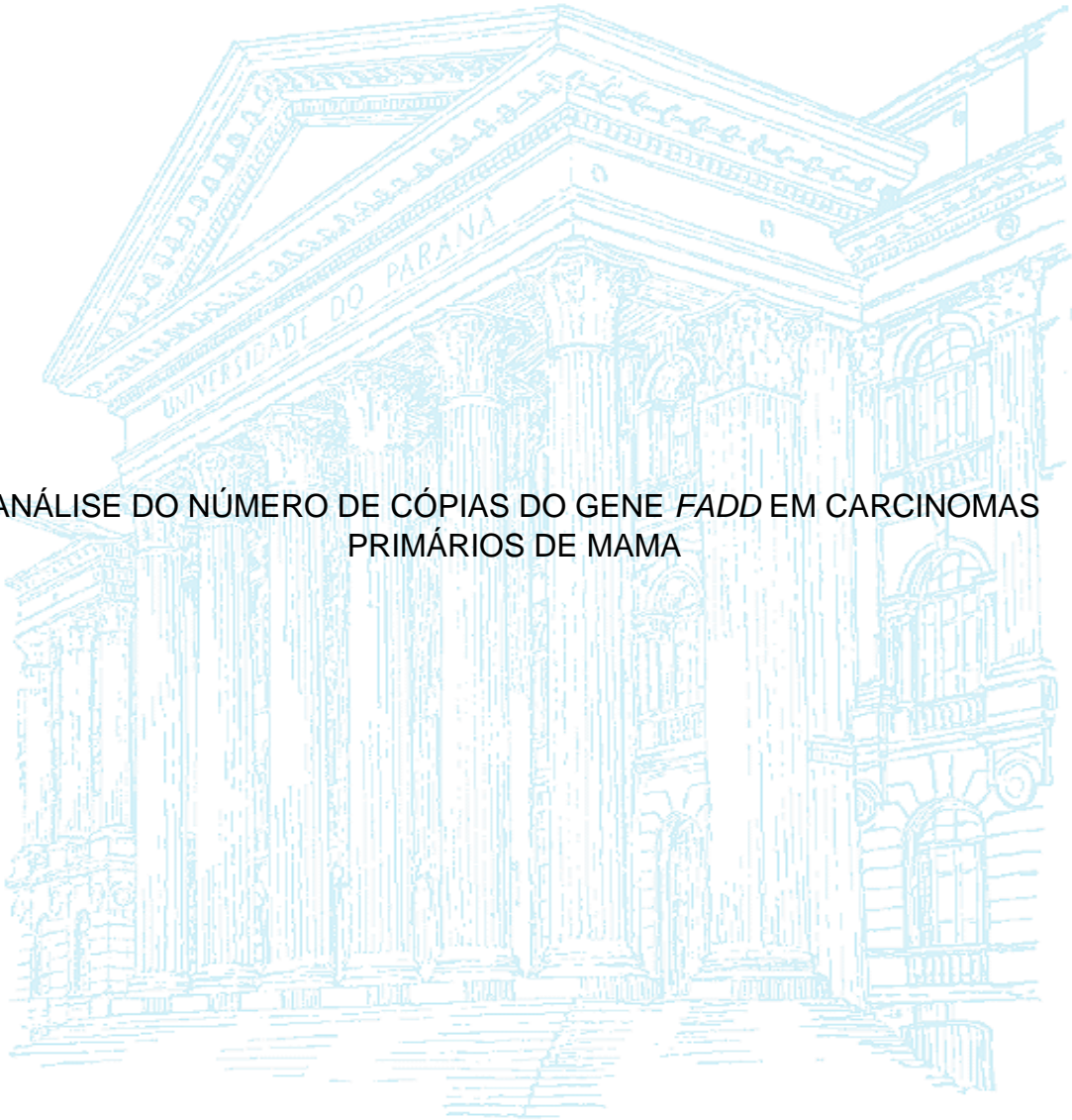


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA MAGAGNIN BRINCAS

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



CURITIBA

2015

HELOISA MAGAGNIN BRINCAS

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

Monografia apresentada à Coordenação de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Enilze Maria de Souza
Fonseca Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Iglenir João Cavalli

CURITIBA

2015

Aos meus pais que sempre zelaram por mim, muito obrigada por tudo, vocês são parte fundamental dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Enilze Ribeiro e ao Prof^o. Dr. Iglenir João Cavalli, que me orientaram de forma brilhante e estiveram muito presentes desde o início, estimulando meu desenvolvimento. Obrigada por mostrarem uma dedicação tão grande para a formação de pesquisadores.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, por todo o companheirismo e bons momentos que passamos juntos nestes anos. Em especial ao Leandro Serino, que desde o início foi meu tutor e amigo e me ensinou muito. E à Tayana Schultz, parceira de tantos experimentos e técnicas, sempre disposta a me ajudar.

Aos grandes amigos que me acompanham desde o começo do curso e me apoiaram em momentos decisórios de minha vida, por todas as risadas, palavras de incentivo e momentos juntos.

À ECOS - Empresa Júnior de Biologia UFPR pelos importantes aprendizados que me ajudaram a realizar meus projetos com excelência.

Às amigas da genética que ajudaram a descontrair e levar os momentos mais difíceis do trabalho com mais leveza. À Carol Mathias que me ajudou no começo quando tudo e todos no laboratório ainda eram novos e desde então tem sido uma grande amiga.

Em especial aos meus pais Cida e Mauricio e meu irmão Heitor, que sempre me apoiaram em todos os meus projetos e sonhos, são eles os responsáveis por eu estar aqui.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Deus, pois é Ele quem molda nossos caminhos.

*“Se não sai de ti a explodir
apesar de tudo,
não o faças”*

Charles Bukowski

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente na população feminina mundial, menos frequente somente que o câncer de pele não melanoma e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira. A mortalidade por esta doença poderia ser muito menor se o diagnóstico fosse realizado precocemente e se tratamentos mais específicos fossem empregados já nos estágios iniciais da doença. Os tumores costumam ser divididos em subtipos de acordo com suas características histológicas e expressão gênica. Para classificação dos tumores costuma-se fazer a análise imuno-histoquímica para se avaliar o *status* dos receptores hormonais e da proteína HER2, subdividindo-os em Luminal A, Luminal B, HER2+, e Triplo-Negativos. O gene alvo deste estudo, o *FADD*, se encontra na região cromossômica 11q13, conhecida por estar amplificada em tumores, e codifica uma proteína adaptadora essencial na transdução de sinais apoptóticos dos receptores de morte e que tem também efeito sobre a progressão do ciclo celular. Com o objetivo de avaliar a presença ou ausência de alteração do número de cópias de *FADD*, de acordo com os subtipos e parâmetros clínicos e histopatológicos de carcinomas primários de mama, 45 amostras foram analisadas, sendo seis triplo-negativas, 13 luminais A, 17 luminais B e nove HER2+. Como alterações no nível genômico são mais estáveis do que no nível de mRNA, diferenças no número de cópias podem auxiliar na correta classificação, na escolha do tratamento e assim ajudar a reduzir a mortalidade. Foi observado um ganho de número de cópias em 53% das amostras analisadas. Utilizando-se o teste *t de Student* e o teste de Kruskal-Wallis não se detectou diferença significativa do número de cópias entre os parâmetros nem entre os subtipos. O número de cópias de *FADD* não demonstrou potencial de discriminação entre os parâmetros analisados, porém era aumentado nas amostras, o que pode ser sugestivo do seu envolvimento na tumorigênese, conferindo vantagem proliferativa e de sobrevivência a estas células cancerosas.

Palavras-Chave: *FADD*. Número de cópias de DNA. Câncer de mama.

Abstract

Breast cancer is the second most frequent cancer among women worldwide, only not as frequent as skin cancer non-melanoma. In Brazil it is the biggest death cause in recurrence of cancer between women. Death rates could be minimized in response to earlier diagnosis and administration of more specific treatments at initial stages of the disease. Tumors are divided in subtypes according to their genomic expression and histological characteristics. To classify these tumors it is usual to perform immuno-histochemical analyses to evaluate the status of the hormonal receptors and of the HER2 protein, subdividing them in four classes: triple-negative, Luminal A, Luminal B and HER2+. This study focuses on the *FADD* gene, localized at the chromosomic region 11q13, which is known to be amplified in cancer cells. The FADD protein encoded by this gene is an adaptor protein essential to the transduction of apoptotic signs from the death receptors, and it is also involved in cell cycle progression. To evaluate whether alterations in *FADD* copy number could differentiate between subtypes and clinical histological parameters, 45 breast cancer samples were analyzed: six triple-negative, 13 luminal A, 17 luminal B and nine HER2+. Since alterations at genomic level as copy number alterations are more stable than mRNA differences, studies of the copy number could be helpful in order to assure a correct classification and determining the right treatment, reducing mortality rates. In our study, 53% of the breast cancer patients had an increase in the copy number of *FADD*. Analyzing our data by using *t Student test* and Kruskal-Wallis test, no differences of copy number were found between subtypes, neither between different histological parameters. *FADD* has not shown potential to discriminate between analyzed parameters, but its increase in cancer comparing to normal tissue, could be an indicative of its involvement in tumorigenesis. *FADD* may confer to these cancer cells proliferative and survival advantage.

Keywords: *FADD*. DNA Copy Number. Breast Cancer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O STATUS DOS RECEPTORES HORMONAIS E DE RECEPTOR HER2	18
FIGURA 2 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11	21
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO GENE <i>FADD</i>	21
FIGURA 4 - MODELO DE SINALIZAÇÃO DE APOPTOSE VIA Fas	22

LISTA DE IMAGENS

IMAGEM 1 - FADD SENDO EXPRESSO NO NÚCLEO E NO CITOPLASMA..... 24

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA	17
QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2014 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA*	15
TABELA 2 – INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO DE ACORDO COM OS SUBGRUPOS	32
TABELA 3: COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE EM ESTUDO.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA	36
GRÁFICO 2 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS	37
GRÁFICO 3 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A	37
GRÁFICO 4 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.	38
GRÁFICO 5 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2+.....	38
GRÁFICO 6 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.....	39
GRÁFICO 7 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS.....	40
GRÁFICO 8 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III.....	41
GRÁFICO 9 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FADD</i> EM PACIENTES EM PRÉ-MENOPAUSA E PÓS-MENOPAUSA.	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER DE MAMA.....	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA	15
2.3 O GENE <i>FADD</i>	20
2.4 ESTUDO DE NÚMERO DE CÓPIAS	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	29
4.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL	32
4.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	33
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 NÚMERO DE CÓPIAS DE ACORDO COM O SUBTIPO DE CARCINOMA MAMÁRIO	36
5.2 PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS	39
5.2.1 Presença e Ausência de Metástase em Linfonodos Axilares	40
5.2.2 Grau Histológico do Tumor.....	41
5.2.3 Idade da Paciente	42
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por diferentes alterações moleculares. Geralmente é originado nas células epiteliais que revestem os ductos e lóbulos mamários. A utilização de uma classificação molecular é de grande relevância na prática clínica sendo muito importante como fator de prognóstico e de previsão de resposta à tratamentos (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011).

A classificação utilizada neste estudo é baseada na classificação molecular em subtipos realizada por Perou *et al.* (2000) posteriormente validada por Sorlie *et al.* (2001 e 2003), e subdivide as neoplasias mamárias em cinco grupos principais: luminal A, luminal B, basal, HER2 positivo (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), e “normal like”. Utilizamos aqui uma classificação simplificada baseada na imuno-histoquímica, segundo Goldhirsch *et al.* (2011).

Neste estudo tivemos o objetivo de contribuir para a classificação de carcinomas primários de mama estimando o número de cópias do gene *FADD*, desde que trabalhos anteriores do nosso grupo com *CGH-array* demonstraram alterações do número de cópias da região cromossômica onde está mapeado este gene. O gene *FADD* se encontra no cromossomo 11, região q13 que se apresenta frequentemente amplificada em células de diversos tipos de câncer (KIM *et al.*, 1996). *FADD* é a principal proteína transdutora dos sinais apoptóticos a partir dos receptores de morte. A presença de *FADD* intranuclear está relacionada também com a progressão no ciclo celular (CHEN *et al.*, 2005; SHEIKH; HUANG, 2003). *FADD* também atua na maturação de linfócitos T e B, em processos inflamatórios e de autofagia (BELL *et al.*, 2008; TOURNEUR; CHIOCCHIA, 2010).

Alguns tratamentos contra o câncer utilizam as vias apoptóticas dependentes de *FADD* como os tratamentos que usam a via TRAIL para levar as células de câncer a apoptose (CHINNAIYAN *et al.*, 2000).


Estas características tornam este gene e seu produto importantes candidatos na gênese e progressão dos carcinomas mamários.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente na população feminina mundial, menos frequente somente que o câncer de pele não melanoma. Corresponde a 23% (1,38 milhões) dos novos casos de câncer diagnosticados na população mundial e 14% (458.400) do número de mortes por câncer (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2014 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA*

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
			Homens	Mulheres	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%

FONTE: Instituto Nacional de Câncer - INCA (2014)

NOTA: *Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Na população brasileira foram estimados 57.120 novos casos de câncer de mama para 2014, estimativa válida também para 2015, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA 2014) (TABELA 01).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença heterogênea em relação às alterações moleculares, à composição celular e aos aspectos clínicos. Os cânceres de mama apresentam em sua maioria origem epitelial (mais de 95%) (TOMASKOVIC-CROOK; THOMPSON; THIERY, 2009). As células que originam as neoplasias mamárias são em sua maioria células que revestem os ductos e os lóbulos

mamários (estes carcinomas são denominados carcinomas ductais e carcinomas lobulares respectivamente). Há também tumores de mama menos frequentes, cuja proliferação celular se inicia de outras células como é o caso dos tumores mucinosos, medulares, tubulares e papilares (GUIMARÃES, 2008).

A primeira lesão que ocorre no processo de formação de carcinoma é a hiperplasia das células epiteliais (sem atipia citológica) e com poucas alterações genéticas. Nesta fase o aumento do número de células é autolimitado. As lesões pré-cancerosas passam então a apresentar uma elevada taxa de divisões celulares e as células começam a apresentar certo grau de atipia citológica. Estas lesões podem progredir para a forma de carcinoma *in situ* (CIS) onde as atipias das células se apresentam bem evidentes e há alto índice de taxa mitótica e alterações genéticas. Os carcinomas *in situ* são considerados carcinomas em que as células neoplásicas não rompem a membrana basal proliferando-se em seu local de origem. Os carcinomas invasivos por sua vez são caracterizados pelo rompimento da membrana basal das células e invasão de tecidos adjacentes iniciando assim o processo de metástase. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama representando cerca de 65% a 80% de todos os casos diagnosticados (EHEMAN *et al.*, 2009; THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2015). Entre os carcinomas não invasivos, o carcinoma ductal *in situ* é o que apresenta maior incidência.

Uma das classificações dos tumores é pelo grau de diferenciação histológica como pleomorfismo nuclear, formação do túbulo/glândula, e atividades mitóticas para os carcinomas invasivos que classificam os tumores em: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) (OLDENBURG *et al.*, 2007).

A classificação do câncer de mama pode ser feita também com base no sistema TNM, proposto pela UICC (*International Union Against Cancer 2013*), que classifica o câncer conforme sua extensão anatômica, determinada clínica e histopatologicamente. Este sistema avalia três parâmetros principais: T que corresponde à extensão do tumor, N que se refere à ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e M que se refere à ausência ou presença de metástase à distância. Adiciona-se então um número a estes

componentes que se refere à extensão maligna da doença tendo-se na classificação T0, T1, T2, T3, T4; N0, N1, N2, N3; e M0 ou M1.

O desenvolvimento da técnica de microarranjos de DNA possibilitou a avaliação de diversas variáveis genéticas simultaneamente, a partir desta técnica foi criada uma melhor classificação das neoplasias mamárias, com o auxílio de recursos de bioinformática (RAKHA *et al.*, 2008). As técnicas moleculares possibilitaram a definição de uma correlação mais detalhada dos tumores no nível genômico. O primeiro trabalho a analisar expressão gênica e diversidade fenotípica no câncer de mama para determinar uma classificação molecular para as neoplasias mamárias foi realizado por Perou *et al.* (2000). Este trabalho posteriormente validado e ampliado por Sorlie *et al.* (2001 e 2003), subdividiu os tumores de mama em cinco grupos principais: luminal A, luminal B, basal, HER2 positivo (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), e “normal like” (QUADRO 1) (FIGURA 1).

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA

Subtipo Molecular	Frequência (%)	ER/PR/ERBB2	CK5/6 EGFR	Genes de Proliferação	Genes Característicos	Grau Histológico	Mutações em TP53	Prognóstico
Basal	10-20	ER-/PR-/ERBB2-	+	Super-expressos	<i>KRT5, CDH3, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2</i>	Alto	Frequentes	Ruim
ERBB2+	10-15	ER-/PR-/ERBB2+	+/-	Super-expressos	<i>ERBB2, GRB7</i>	Alto	Frequentes	Ruim
Normal-like	5-10	ER-/PR+ ERBB2-	+	Pouco expressos	<i>PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7</i>	Baixo	Poucas	Intermediário
Luminal-A	50-60	ER+/PR+/ERBB2-	-	Pouco expressos	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1</i>	Baixo	Poucas	Excelente
Luminal-B	10-20	ER+/- PR+/- ERBB2-/+	-	Super-expressos	<i>ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B</i>	Intermediário /Alto	Intermediário	Intermediário/Ruim

LEGENDA: Receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), *human epidermal growth factor receptor 2* - HER2 (ERBB2), citoqueratinas 5 e 6 (CK5/6), *epidermal growth factor receptor gene* (EGFR), *tumor protein p53 gene* (TP53), positivo (+), negativo (-).

FONTE: Adaptado de EROLES *et al.* (2012)

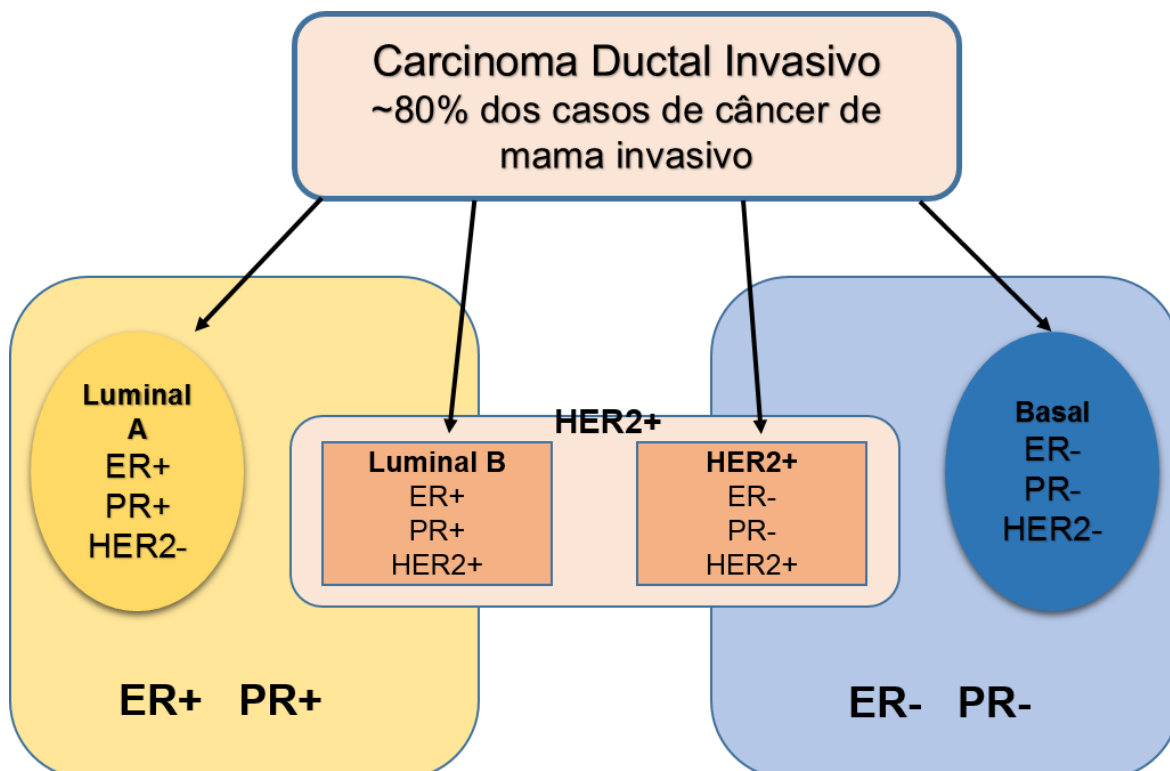


FIGURA 1 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O STATUS DOS RECEPTORES HORMONAIS E DE RECEPTOR HER2

LEGENDA: Receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), Receptor de HER2 (HER2), (+) indica presença, (-) indica ausência.

FONTE: Adaptado de SANDHU *et al.* (2010)

O subtipo Luminal A representa 50-60% dos casos de câncer, sendo assim o subtipo mais frequentemente observado (EROLES *et al.*, 2012). Este grupo apresenta positividade para os receptores de estrogênio e progesterona e negatividade para o receptor HER2, além de baixa expressão de genes de proliferação celular, o prognóstico para esse subtipo é favorável e normalmente é utilizada terapia hormonal, sendo a quimioterapia restrita a alguns casos específicos.

O subtipo Luminal B representa 10 a 20% de todos os casos de câncer de mama, apresenta positividade para os receptores de estrogênio e progesterona e na maioria das vezes HER2 apresenta-se positivo. Em comparação com o luminal A apresentam um fenótipo mais agressivo, um maior grau histológico e um pior prognóstico, resultantes da maior expressão de genes de proliferação como o *MKI67* e a *ciclina-B1* (EROLES *et al.*, 2012). Os tratamentos comumente

utilizados são a terapia hormonal, como o Tamoxifeno (um modulador seletivo do receptor de estrogênio) e a quimioterapia.

Quinze a vinte por cento de todos os cânceres de mama são do subtipo HER2⁺ (EROLES *et al.*, 2012). Este subtipo apresenta negatividade para os receptores hormonais e alta expressão do receptor HER2 e genes associados. Com um alto potencial proliferativo e alto grau histológico seu prognóstico não é favorável e normalmente é utilizado Trastuzumab (um anticorpo monoclonal direcionado ao receptor HER2) e quimioterapia como forma de tratamento. Na maioria dos casos apresentam melhor resposta a quimioterapia do que os subtipos luminais.

Os tumores do subtipo basal representam entre 10 a 20% dos tumores mamários, e apresentam negatividade para os três receptores (estrogênio, progesterona e HER2) e expressam EGFR e CK5/6. Tendem a ser carcinomas ductais infiltrantes com alto índice mitótico, necrose tumoral e margens em expansão. Mesmo apresentando uma boa resposta à quimioterapia a reincidência do subtipo basal costuma ser agressiva atingindo principalmente os órgãos viscerais (principalmente o pulmão), o sistema nervoso central e linfonodos. Costuma apresentar alta taxa de mutação no gene *TP53* o que ajuda a explicar sua agressividade (SØRLIE *et al.*, 2001).

O subtipo “*normal-like*” representa entre 5 a 10% dos carcinomas mamários. Expressa genes característicos de tecido adiposo e o prognóstico é intermediário entre os subtipos luminal e o basal. Geralmente não expressam os três receptores (estrogênio, progesterona e HER2) podendo ser considerados triplo negativo (TN) sem serem considerados basais por não terem expressão de EGFR e CK5 (EROLES *et al.*, 2012). É provável que não representem verdadeiramente um subgrupo, acredita-se que sejam artefatos da contaminação dos microarranjos por tecido normal.

Ainda existe um sexto subtipo o “*claudin-low*” identificado por Herschkowitz *et al.* (2007), e caracterizado por uma baixa expressão de genes de junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula incluindo as claudinas -3, -4, -7, as ocludinas e a E-caderina. Exibe baixa expressão de HER2 e de genes luminais e superexpressa 40 genes relacionados à resposta imune. Apesar de terem baixa expressão de genes relacionados à proliferação celular

apresentam um prognóstico ruim, pois expressam genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (EROLES *et al.*, 2012).

Atualmente ainda não estão completamente estabelecidas as diferenças entre os tumores do subtipo basal e os triplos negativos. Ambos negativos para os receptores de estrogênio, progesterona e HER2, apresentam prognóstico não favorável, pois não respondem a terapias hormonais ou ao Trastuzumab, sendo a quimioterapia a melhor opção nesses casos.

2.3 O GENE *FADD*

O *FADD*, gene alvo do presente estudo, foi escolhido a partir de estudo anterior de nosso grupo de pesquisa realizado por Torresan (2011) em colaboração com a Georgetown University, Washington, DC, USA. O estudo de Torresan aplicou a metodologia de *CGH-array* para investigar alterações do número de cópias do DNA de amostras de tumores primários e metástases axilares. Os resultados dos ensaios apontaram que 90% das alterações mais frequentes eram comuns aos dois grupos estudados e se localizavam preferencialmente nas regiões cromossômicas 8q24.3, 11p15.5-p15.4, 11q13.1-q13.4, 16p11.2, 17q12-q21, 17q25.1-q25.3, 20q13.33, 21q22.3 e Xq13.1. Foram identificados então os genes presentes nestas regiões selecionadas, dentre eles estavam muitos genes que já haviam sido associados ao câncer de mama, como o *FADD* (TORRESAN, 2011).

O gene *FADD* contém dois éxons, extensão de aproximadamente 3,6kb e foi mapeado pelo estudo de KIM *et al.* (1996) no cromossomo 11, região q13.3 (FIGURA 2). Esta é uma região descrita como amplificada em vários tipos de câncer e estes autores verificaram amplificação do *FADD* em uma linhagem celular de câncer de mama a MDA-MB-134-VI. Os dois éxons do gene *FADD* são separados por um íntron de aproximadamente 2.0 kb, e as regiões codificadoras do éxon 1 e 2 apresentam um comprimento de 286 e 341 bp respectivamente (FIGURA 3) (KIM *et al.*, 1996).

Este gene é responsável pela codificação da proteína FADD (*Fas-associated protein with death domain*), também chamada MORT1, que em

humanos, foi por muito tempo considerada uma proteína estritamente citoplasmática. Atualmente sabe-se que está presente também no núcleo celular (GÓMEZ-ANGELATS; CIDLOWSKI, 2003). FADD é a principal molécula adaptadora a fazer a transmissão dos sinais apoptóticos a partir dos receptores de morte e desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário (TOURNEUR; CHIOCCHIA, 2010).

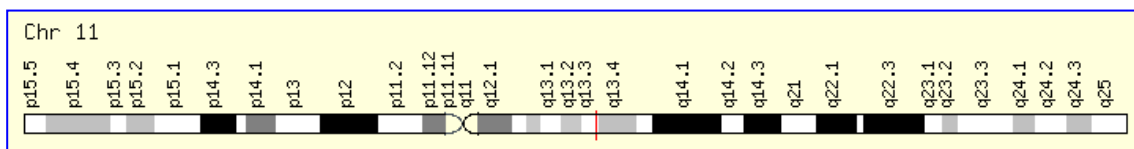


FIGURA 2 - APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO 11
 LEGENDA: Em vermelho está a localização do gene *FADD*.
 FONTE: <http://www.genecards.org/> (2015)

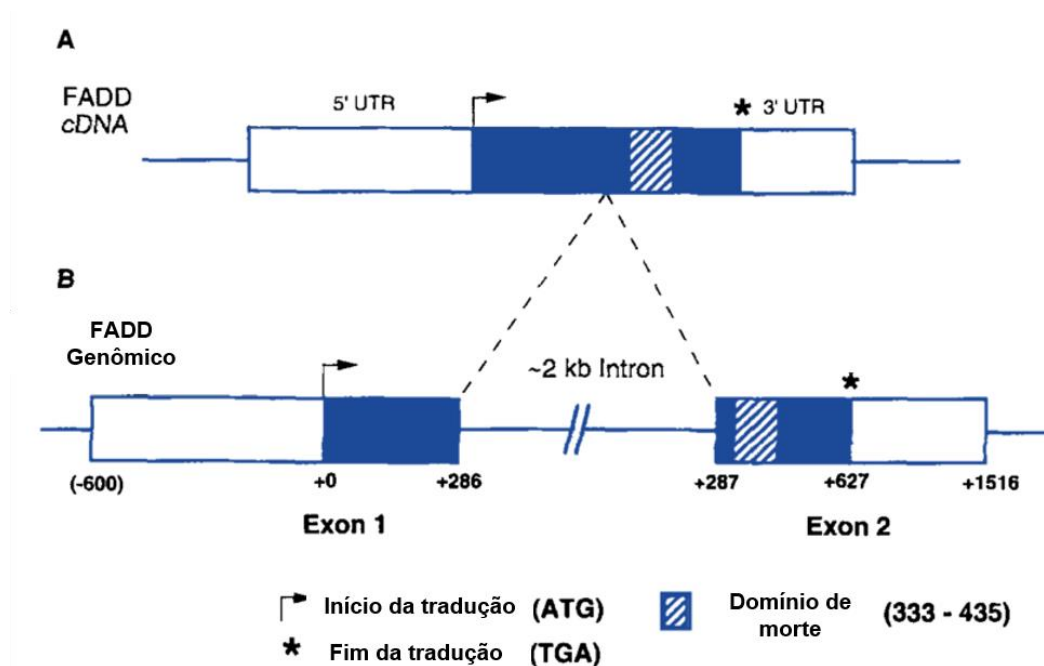


FIGURA 3 - ESTRUTURA DO GENE *FADD*

LEGENDA: A, Representação do cDNA do *FADD*. B, representação do gene e da organização de seus éxons/íntrons. As caixas azuis representam os éxons, sendo a região sem preenchimento a região não codificadora e a região preenchida a região codificadora, as linhas representam os íntrons. O domínio de morte está representado pela região hachurada. As bases estão numeradas de acordo com o sítio correspondente ao início de tradução.

FONTE: Adaptado de KIM et al. (1996)

Conhecida por sua interação com Fas (FIGURA 4) e com o TNFR1 (receptor do fator de necrose tumoral) a FADD faz o recrutamento e ativação das

procaspases 8 e 10 levando a célula à apoptose. FADD é uma molécula adaptadora que pode transduzir os sinais apoptóticos também pelas vias do DR3 (*death receptor 3*), e do TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis inducing ligand-receptor*) também conhecido como DR4 (*death receptor 4*) e do TRAIL-R2 também conhecido como DR5 (*death receptor 5*) (SCHNEIDER *et al.*, 1997; SHERIDAN *et al.*, 1997).

A proteína de 23-kDa é constituída por 208 aminoácidos e possui dois domínios principais, o domínio de morte (DD) na extremidade C-terminal e o domínio efetor de morte (DED) na extremidade N-terminal. O domínio de morte (DD) é responsável pela ancoragem da mesma nos receptores de morte e a partir daí recruta e ativa o complexo DISC (do inglês *death-inducing signaling complex*) que por sua vez ativará as procaspases 8 e 10 recrutadas pelo domínio efetor de morte (DED) (SCAFFIDI *et al.*, 1998; SPRICK *et al.*, 2002).

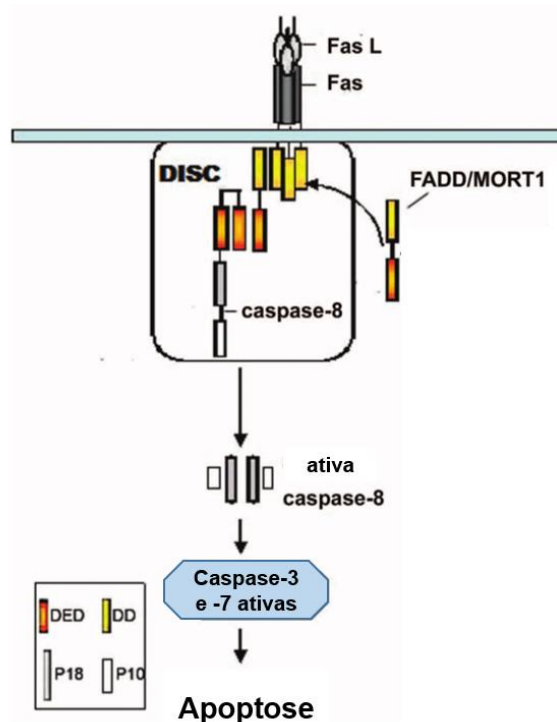


FIGURA 4 - MODELO DE SINALIZAÇÃO DE APOPTOSE VIA Fas

LEGENDA: A ativação do Fas a partir da ligação de FasL recruta FADD/MORT1, que possui seu domínio de morte (DD) e o domínio efetor de morte (DED). FADD se liga ao Fas (através de interações DD-DD) e recruta caspase-8 (através de uma interação DED-DED). Este agregado de Fas, FADD e caspase-8 foi denominado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) e permite a autoativação proteolítica da caspase-8 que gera caspase-8 ativa (constituída por p18 e p10). Esta caspase ativa ativará outras caspases efetoras levando à morte celular.

FONTE: Adaptado de ZHANG; ZHANG; HUA (2004)

Para exemplificar uma via apoptótica em que FADD é necessária pode-se observar a morte por apoptose induzida pelo receptor TRAIL-R1, R2. A molécula indutora de apoptose TRAIL se liga aos receptores DR4 e/ou DR5 na superfície da célula, isto desencadeia o recrutamento dos elementos do complexo DISC através da proteína ativadora FADD, a qual recruta e possibilita a ativação das proteases iniciadoras de apoptose, caspase 8 e/ou 10. Após estarem ativadas estas caspases fazem a clivagem proteolítica das caspases efetoras (caspases 3, -6, e 7-) que por sua vez induzirão as respostas que levam à morte celular (BHOJANI; ROSSÚ; REHEMTULLA, 2003).

Estudos mostram que a forma dominante negativa da FADD (que apresenta a região DD conservada, porém não tem a região DED), é capaz de interagir com os receptores Fas e TNFR-1, mas não permite a ativação das vias apoptóticas através dos mesmos (CHINNAIYAN *et al.*, 1996). No estudo de Chinnaiyan *et al.* (1996) foi testado também se a forma dominante negativa do FADD apresentava efeito sobre uma via alternativa regulada pelo TNFR-1 (a via de ativação de NF- κ B). As células que apresentavam a forma dominante negativa de FADD não apresentaram diferença no nível de ativação de NF- κ B, confirmando que a FADD atua exclusivamente na via apoptótica de Fas e TNFR-1, sendo que na ausência da proteína funcionalmente normal, ocorre uma redução significativa da apoptose.

Gómez-Angelats e Cidlowski (2003) em seus estudos descobriram evidências da presença nuclear de FADD e comprovaram a existência de domínios de sinalização de localização nuclear (NLSs) na sequência de aminoácidos de FADD. Foi detectada a expressão constitutiva de FADD tanto no citoplasma quanto no núcleo de diferentes linhagens celulares por microscopia confocal. Foram estudadas as linhagens de células HeLa, HEK 293, Jurkat, HTC, COS-1, and A549 que foram marcadas com anticorpo monoclonal do domínio DD de FADD ou com anticorpo monoclonal que reconhece a forma fosforilada de FADD. As células que apresentaram FADD concentrada em seus núcleos foram as da IMAGEM 1, painéis a,b,d,f. Enquanto que as células Jurkat apresentaram em 50% da população de células FADD no núcleo e outro 50% apresentou FADD concentrada no citoplasma (IMAGEM 1c) (GÓMEZ-ANGELATS; CIDLOWSKI, 2003).

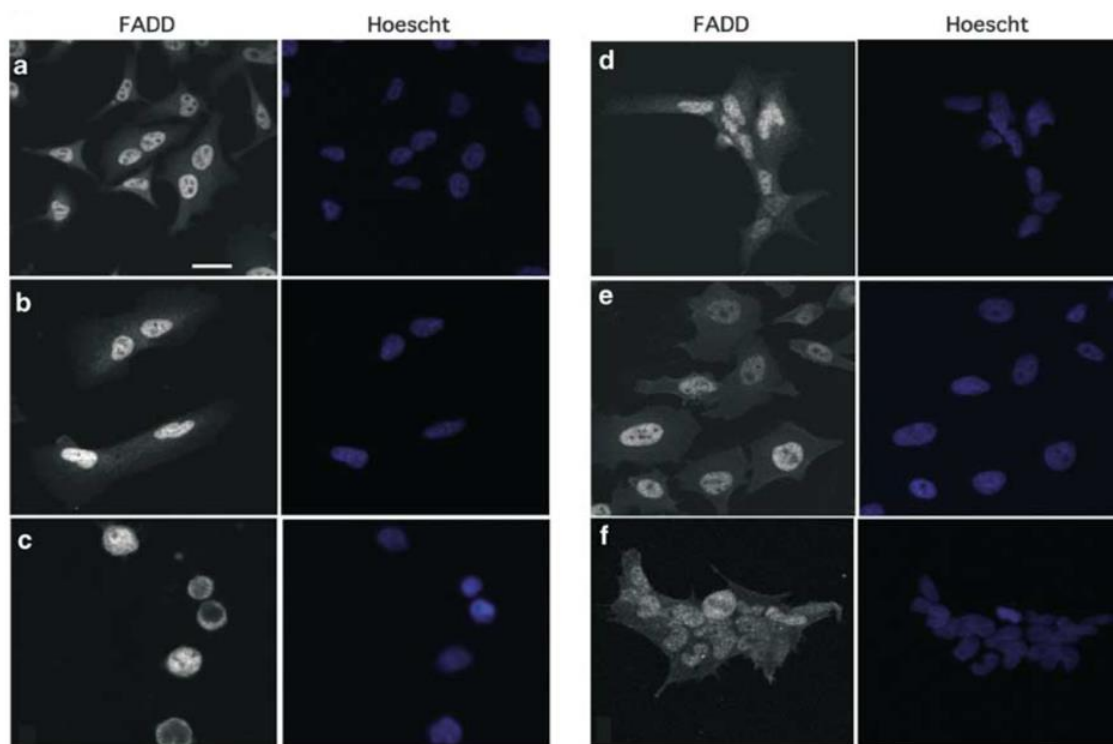


IMAGEM 1 - FADD SENDO EXPRESSO NO NÚCLEO E NO CITOPLASMA

LEGENDA: Imagem por imunofluorescência da distribuição endógena de FADD em microscópio confocal de células HeLa (**a e e**), A549 (**b**), Jurkat (**c**), e HEK 293 (**d e f**) mostradas nos painéis a esquerda e sua respectiva marcação nuclear (Hoechst) nos painéis da direita. Células fixadas expostas a anticorpo monoclonal anti-FADD IgG mais Alexa Fluor 594 anti-rato (**a-d**) e anticorpo policlonal de coelho anti-FADD mais FITC-marcado anti-coelho (**e e f**).

FONTE: GÓMEZ-ANGELATS; CIDLOWSKI (2003)

Um dos níveis de regulação da FADD em mamíferos ocorre por via da fosforilação de FADD na serina-194 por uma quinase de 70-kDa ainda não identificada relacionada ao ciclo celular, mesmo com a fosforilação da FADD ambas as formas de FADD interagem normalmente com os receptores de morte (SCAFFIDI *et al.*, 2000).

O papel da FADD na indução da proliferação celular e na tumorigênese ainda não é bem entendido, o artigo de CHEN *et al.* (2005) elucidada em partes esta questão. Neste trabalho eles comprovaram a evidência de que FADD fosforilada (p-FADD) tem papel importante na translocação de FADD para o núcleo e na progressão do ciclo celular. Já havia sido reportado que a mutação de uma serina na posição 194 para uma alanina levava a concentração de FADD restrita ao citoplasma e a problemas na progressão celular (HUA *et al.*, 2003). Os casos de câncer de pulmão com níveis aumentados de FADD mRNA e proteína estão

relacionados de forma significativa com uma reduzida taxa de sobrevivência (CHEN *et al.*, 2005). A partir dessa constatação CHEN *et al.* (2005) desenvolveram ensaios de microarranjos de tecido que mostraram que a localização nuclear de FADD e o aumento de concentração de sua forma fosforilada (p-FADD) levam a um pior prognóstico. Para testar a relação entre FADD que se apresenta fosforilada no resíduo Ser194 do domínio C-terminal e a atividade apoptótica e a ativação de NF-kB os autores criaram diversos mutantes de FADD com a região Ser194 modificada para outro aminoácido. Então verificaram que as células mutadas, incapazes de sofrer fosforilação, não tiveram sua atividade de apoptose alterada, em contrapartida a forma mutada apresentou uma atividade de NF-kB reduzida mostrando que a fosforilação de FADD é importante para a ativação de NF-kB. As células expressando p-FADD normal apresentaram maior ativação de NF-kB e maior expressão de ciclinas B1 e D1 que são importantes na progressão G2/M do ciclo celular, são induzíveis pelo fator NF-kB e estão relacionadas com pior prognóstico em casos de adenocarcinomas de pulmão (CHEN *et al.*, 2005). Em resumo, estes estudos mostram que esta indução da atividade de NF-kB e conseqüentemente o efeito de progressão de ciclo celular que isto causa, pode ser a chave para se explicar a maior agressividade associada a níveis elevados de p-FADD nos adenocarcinomas de pulmão e talvez também em outros tipos de câncer (CHEN *et al.*, 2005).

Além da função de apoptose FADD está envolvida na regulação do processo de doenças autoimunes, pois age na regulação do desenvolvimento de linfócitos T e B, no desenvolvimento do câncer, atuando também na proliferação e na progressão do ciclo celular, sinalização de processos inflamatórios, necrose e autofagia (KABRA *et al.*, 2001; SCHAUB *et al.*, 2000; TOURNEUR; CHIOCCHIA, 2010; VIRGIN; LEVINE, 2009). Desempenha um papel importante nos diferentes estágios do desenvolvimento do tumor podendo atuar também como um supressor de tumor sendo que sua ausência resulta em resistência a quimioterapia, escape do sistema imune e vantagem proliferativa (TOURNEUR; BUZYN; CHIOCCHIA, 2005).

Sendo assim, o melhor conhecimento de suas características, poderá possibilitar o desenvolvimento de drogas específicas para controlar o processo de

morte celular (TOURNEUR; BUZYN; CHIOCCHIA, 2005) e possibilitará o aprimoramento das drogas em fase de desenvolvimento que atuam na modulação da morte celular em diversos tipos de câncer (CHINNAIYAN *et al.*, 1996). Como exemplo têm-se as drogas indutoras de morte celular via receptor de morte TRAIL onde a ativação da apoptose depende da presença da proteína FADD (CHINNAIYAN *et al.*, 2000). Sabe-se que TRAIL tem uma preferência por causar a morte de células transformadas ao invés das células saudáveis o que torna esta via interessante para o combate de tumores (ASHKENAZI *et al.*, 1999). Moléculas capazes de impedir a fosforilação de FADD, como a NSC 47147, estão em fase de teste e mostraram efeitos positivos, foram capazes de aumentar a taxa de apoptose e reduzir o efeito de progressão no ciclo celular através da redução da ativação de NF-kB (SCHINSKE *et al.*, 2011).

Neste trabalho avaliamos o número de cópias do gene *FADD* para auxiliar na compreensão da atuação no processo da carcinogênese mamária e também averiguar se a variação do número de cópias pode vir a ser um auxiliar na diferenciação dos diferentes subtipos, de acordo com a classificação imuno-histoquímica.

2.4 ESTUDO DE NÚMERO DE CÓPIAS

Alterações no número de cópias são observadas em mais de 95% dos casos de câncer de mama e correspondem a grande parte das alterações do genoma das células de câncer de mama (NATRAJAN *et al.*, 2010).

Como o DNA genômico é mais estável do que o mRNA, e uma vez que as alterações no número de cópias são um evento genético chave na tumorigênese, conhecer estas alterações genômicas é vantajoso como fator preditivo e de prognóstico (BERGAMASCHI *et al.*, 2006).

Bergamaschi *et al.* (2006) descreveram uma diferença significativa nas alterações de número de cópias que ocorrem entre os diferentes subtipos (basal, luminal A, luminal B e HER2+). Em subtipos basais ganhos e perdas de número de cópias são mais frequentes e o subtipo em que as alterações no número de cópias foram menos frequentes foi o subtipo HER2+. Em relação a ampliações

no DNA o subtipo luminal B foi o subtipo que apresentou ampliações com maior frequência (BERGAMASCHI *et al.*, 2006).

No estudo de CHEN *et al.* (2005) o número de cópias e a sequência de *FADD* analisada em 24 tumores de mama independentes demonstrou a existência de *FADD* amplificado e/ou mutado nos cânceres de pulmão mais agressivos.

As alterações de número de cópias de baixo nível são positivamente selecionadas e se mantêm na população de células. A análise dos genes que são desregulados por essas alterações mostrou que há muitos genes envolvidos no metabolismo celular e de RNA que estavam sendo mais expressos. Isso nos sugere que estas alterações menores no número de cópias foram selecionadas durante os primeiros estágios do câncer, pois elas aumentam o metabolismo basal das células providenciando a estas uma vantagem proliferativa e de sobrevivência (CHIN *et al.*, 2006).

O estudo de CHIN *et al.* (2006) mostrou que combinando-se a análise de expressão de genes com a análise de número de cópias, pode-se aumentar a acurácia com a qual as pacientes podem ser avaliadas quanto ao prognóstico. Ainda neste estudo foram identificadas algumas regiões de alto nível de amplificação e/ou de expressão de genes em 8p11, 11q13 (região em que o *FADD* está localizado), 17q12, e/ou 20q13 que demonstraram serem indicadores de baixa expectativa de sobrevivência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar se o número de cópias do gene *FADD* pode ser um auxiliar na diferenciação dos subtipos de carcinomas mamários, classificados de acordo com a imuno-histoquímica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar alterações do número de cópias dos genes *FADD* em carcinomas primários de mama dos subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2⁺ e triplo negativo.
- Comparar os resultados obtidos entre os subtipos, correlacionando com parâmetros clínicos e histopatológicos.
- Comparar estes resultados com os já descritos na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de carcinomas primários utilizadas no presente estudo foram coletadas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) durante o procedimento cirúrgico. Todo material biológico utilizado foi obtido após assinatura do consentimento livre e esclarecido pelas pacientes. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG (Registro CONEP 7220).

As 45 amostras utilizadas, foram processadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As amostras estão caracterizadas de acordo com: idade das pacientes, características histopatológicas e características imuno-histoquímicas (QUADRO 1). Estas informações sobre os parâmetros clínicos e histopatológicos foram obtidas a partir dos laudos anatomopatológicos e o número de informações é variável entre as pacientes, conforme demonstrado na TABELA 2.

As amostras utilizadas nesse trabalho foram classificadas de acordo com os resultados da análise imuno-histoquímica utilizando-se o *status* dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e da proteína HER2 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011). Desta forma foram divididas em 4 grupos:

- Positivas para os receptores hormonais e negativas para HER2 - Luminal A;
- Positivas para os 3 receptores - Luminal B;
- Negativas para os receptores hormonais e positivas para HER2 - HER2+.
- Negativas para os 3 receptores - triplo negativo;

QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

Paciente	Idade	Diagnóstico	L	G	ER	PR	HER2
1	45	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (>5%)	P	II	NEG	NEG	NEG
2	51	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	A	II	NEG	NEG	NEG
3	43	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	NEG
4	66	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	NEG	NEG	NEG
5	62	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	NEG
6	35	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	NEG	NEG	NEG
7	45	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	NEG
8	54	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
9	33	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	-	POS	POS	NEG
10	38	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
11	-	Carcinoma Ductal Invasor	P	-	POS	POS	NEG
12	62	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	III	POS	POS	NEG
13	97	Carcinoma Ductal Invasor		-	POS	POS	NEG
14	44	Carcinoma Ductal Invasor SOE	P	II	POS	POS	NEG
15	62	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
16	72	Carcinoma Ductal Invasor associado a carcinoma intraductal comedocarcinoma	A	II	POS	POS	NEG
17	73	Carcinoma Ductal Invasor	P	II	POS	POS	NEG
18	46	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Ductal in situ sólido cibriforme	P	III	POS	POS	NEG
19	81	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	NEG
20	79	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (>5%)	A	I	POS	POS	POS
21	70	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (9%)	A	I	POS	POS	POS
22	53	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	III	POS	POS	POS
23	51	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
24	46	Carcinoma Lobular Invasor	A	II	POS	POS	POS
25	40	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	II	POS	POS	POS
26	72	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	A	I	POS	POS	POS
27	63	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS
28	56	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	II	POS	POS	POS
29	51	Carcinoma Ductal Invasor	A	III	POS	POS	POS
30	47	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	POS	POS	POS
31	54	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (5%)	P	II	POS	POS	POS

32	44	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma intraductal	A	II	POS	POS	POS
33	82	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	POS	POS	POS
34	60	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal	P	I	POS	POS	POS
35	61	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (10%)	P	II	POS	POS	POS
36	70	Carcinoma Ductal Invasor multifocal	P	-	POS	POS	POS
37	63	Carcinoma Ductal Invasor, associado a Carcinoma Intraductal (20%)	P	III	NEG	NEG	POS
38	53	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	POS
39	72	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
40	43	Carcinoma Ductal Invasor	A	II	NEG	NEG	POS
41	44	Carcinoma Ductal	P	-	NEG	NEG	POS
42	55	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
43	58	Carcinoma Ductal Invasor associado a CDIS e comedocarcinoma	P	II	NEG	NEG	POS
44	89	Carcinoma Ductal Invasor	P	III	NEG	NEG	POS
45	84	Carcinoma Ductal Invasor, comedocarcinoma	P	III	NEG	NEG	POS

LEGENDA: Idade, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; L, presença ou ausência de metástases nos linfonodos axilares; P, presença; A, ausência; G, grau histológico do tumor; ER, *status* do receptor de estrogênio; PR, *status* do receptor de progesterona; HER2, aumento de expressão da proteína HER2.

FONTE: A autora (2015)

TABELA 2 – INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES PORTADORAS DE CARCINOMA MAMÁRIO DE ACORDO COM OS SUBGRUPOS

	N	Idade Média	Grau (%)	Metástase em linfonodos
ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ Tripla Negativo	6	50,3 ± 11,8	Grau I (0%) Grau II (66,7%) Grau III (33,3%)	P (50%) A (50%)
ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ Luminal A	13	58,9 ± 19,1	Grau I (0%) Grau II (70%) Grau III (30%)	P (83,3%) A (16,7%)
ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁺ Luminal B	17	58,8 ± 12,4	Grau I (25%) Grau II (50%) Grau III (25%)	P (47%) A (53%)
ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺ HER2 ⁺	9	62,3 ± 16,4	Grau I (0%) Grau II (37,5%) Grau III (62,5%)	P (77,8%) A (22,2%)

LEGENDA: (ER) receptor de estrogênio, (PR) receptor de progesterona, (HER2) *Human Epidermal growth factor receptor 2*, (N) número amostral, (P, A) presença, ausência de metástase em linfonodos axilares.

FONTE: A autora (2015)

4.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Utilizando-se tesouras e pinças esterilizadas e placas de Petri descartáveis processou-se as amostras para a remoção de tecido estromal, tecido adiposo e vasos sanguíneos. Após processado o material foi estocado em tubos do tipo *Eppendorf* e mantido a -80 °C até o momento da extração de DNA.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA utilizou-se fragmentos de amostras de tumor homogeneizados no vórtex em 130 µL de tampão de proteinase K e 70 µL de

proteínase K (10 µg/mL). A mistura permaneceu incubada em banho-maria a 55 °C por 24 horas. Em seguida incubaram-se as amostras em banho seco a 95 °C por 10 minutos para a inativação da proteínase K. Posteriormente foi adicionado um volume de fenol:clorofórmio:álcool-iso-amílico 25:24:1 v/v, realizada a homogeneização no vórtex por 15 segundos e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos (esta etapa foi realizada duas vezes). Foram adicionados dois volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5 M, e mantido no freezer -20 °C por 24 horas. Em seguida centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante, seguido da adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o DNA ressuspendido em 40 µL de água ultra pura.

4.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Com a técnica de PCR quantitativa determinamos o número de cópias do gene *FADD* nas 45 amostras (QUADRO 2).

Para a avaliação do número de cópias foi utilizado o ensaio *TaqMan® Copy Number Assays* da empresa *Life Technologies™*. Este método é baseado em uma reação dupla de PCR em tempo real capaz de detectar a sequência do gene alvo do estudo e a sequência de um gene de referência (*RNASE P*) conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diploide. Este método de detecção relativa é usado para determinar o número de cópias do gene de interesse em um DNA de referência. Neste trabalho, para fins de simplificação, este ensaio (*TaqMan® Copy Number Assays*) será referido como PCR em tempo real.

Em todas as placas foi inserido, além das amostras tumorais, um DNA controle com o número de cópias do gene de interesse conhecido, este DNA genômico é composto por um *pool* de amostras de indivíduos que não apresentam a doença. Para cada reação foram utilizados: 5 µL de *Master Mix*, 2 µL de DNA (na concentração de 5 ng/µL), 0,5 µL de mix do gene de estudo (contendo o par de *primers* e sonda *TaqMan®*), 0,5 µL de mix do gene *RNASE P* (*primers* e sonda *TaqMan®*) e 2 µL de água ultra pura, totalizando 10 µL de

volume de reação. Todas as amostras, incluindo o DNA controle foram analisadas em triplicatas na placa. Os reagentes utilizados nestas reações e as especificações do ciclo de PCR encontram-se descritos na TABELA 3. O equipamento empregado foi o *Viiia 7* da *Applied Biosystems*TM.

As análises foram realizadas utilizando-se o *software Copy Caller (Life Technologies*TM). Não foram consideradas amostras que apresentaram valor de CT > 33 ciclos e valor de z-score ≥ 2.65 . O número de cópias do DNA teste foi calculado pelo *software Copy Caller* que considera ganho quando o número de cópias calculado está em 2,51 ou acima, perda quando está em 1,49 ou abaixo e normal quando está entre 1,50 e 2,50.

Este método é adotado devido à padronização prévia dos ensaios de *primers* e sondas comercializados pela empresa, que fornecem uma eficiência de reação de 100%, possibilitando que as curvas de amplificação entre os genes testados e o gene de referência possam ser comparadas com precisão.

TABELA 3: COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD*.

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

FONTE: A autora (2015)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de número de cópias obtidos foram agrupados de acordo com os subtipos e com os diferentes parâmetros clínicos e histopatológicos. Então foram submetidos ao teste *t* de *Student* para avaliar a diferença de número de cópias entre os parâmetros clínicos e histopatológicos.

Para avaliação das diferenças entre os subtipos realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando o método de Dunn para a comparação entre os grupos. Para a realização dos testes foi utilizado o *software GraphPad Prism Version 6.01* para *Windows* (Disponível em: www.graphpad.com).

5 RESULTADOS

5.1 NÚMERO DE CÓPIAS DE ACORDO COM O SUBTIPO DE CARCINOMA MAMÁRIO

A análise da alteração do número de cópias do gene *FADD* em 45 amostras de carcinomas primários de mama revelou que o mesmo apresenta um número de cópias alterado na maior parcela da amostra. Foi detectado na maioria dos casos, em 53%, um ganho do número de cópias, 42% da amostra apresentaram um número de cópias normal e uma pequena parcela, apenas 5%, apresentou redução no número de cópias (GRÁFICO 1).

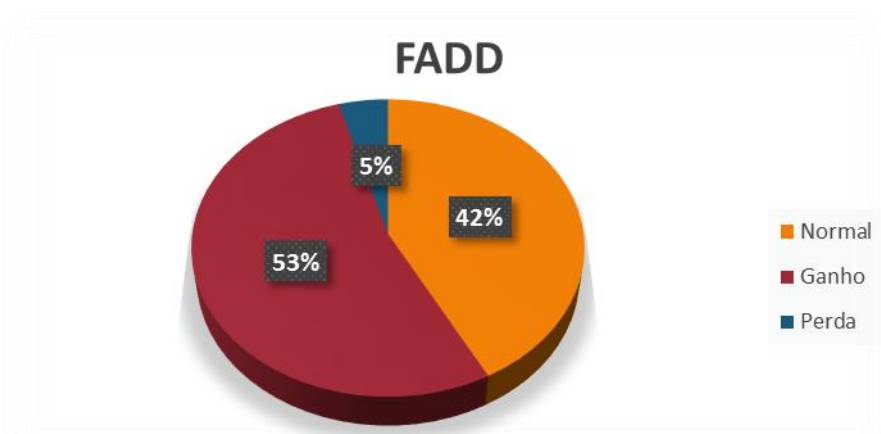


GRÁFICO 1 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA
FONTE: A autora (2015)

Para cada subtipo (Triplo Negativo, Luminal A, Luminal B, HER2+) foi realizada a análise da alteração de número de cópias separadamente. O gene *FADD* apresentou em média $3,33 \pm 2,4$ cópias no subtipo Triplo Negativo, no subtipo Luminal A apresentou em média $2,71 \pm 0,6$, o Luminal B, $4,10 \pm 4,7$, e para o subtipo HER2+ a média foi $3,30 \pm 1,6$ de número de cópias do *FADD*. Estão apresentados nos GRÁFICOS 2, 3, 4 e 5 os números de cópias do gene *FADD* por amostra de acordo com o subtipo do carcinoma mamário. Analisando-se todas as amostras sem distinção obteve-se uma média de número de cópias

aumentada nos carcinomas primários de mama em relação ao tecido normal de $3,43 \pm 3,1$.

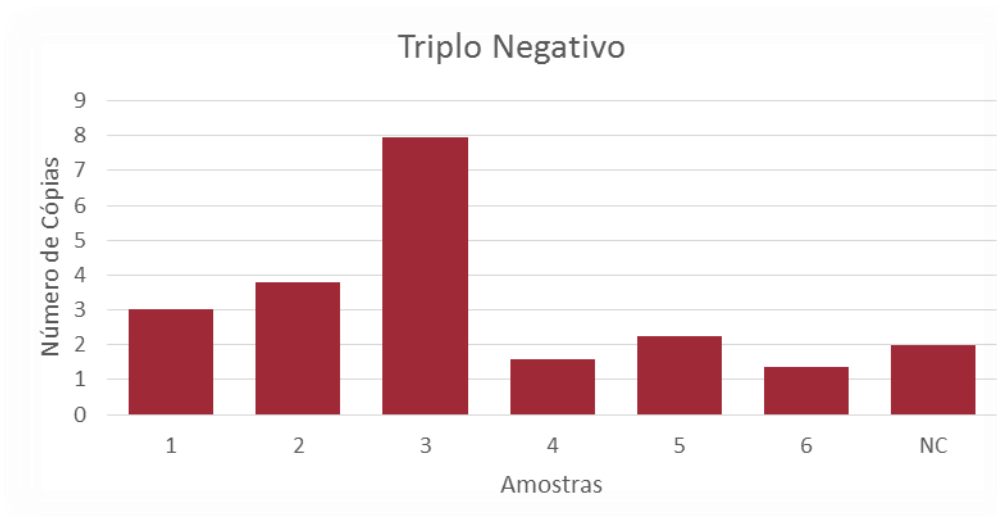


GRÁFICO 2 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS
 FONTE: A autora (2015)

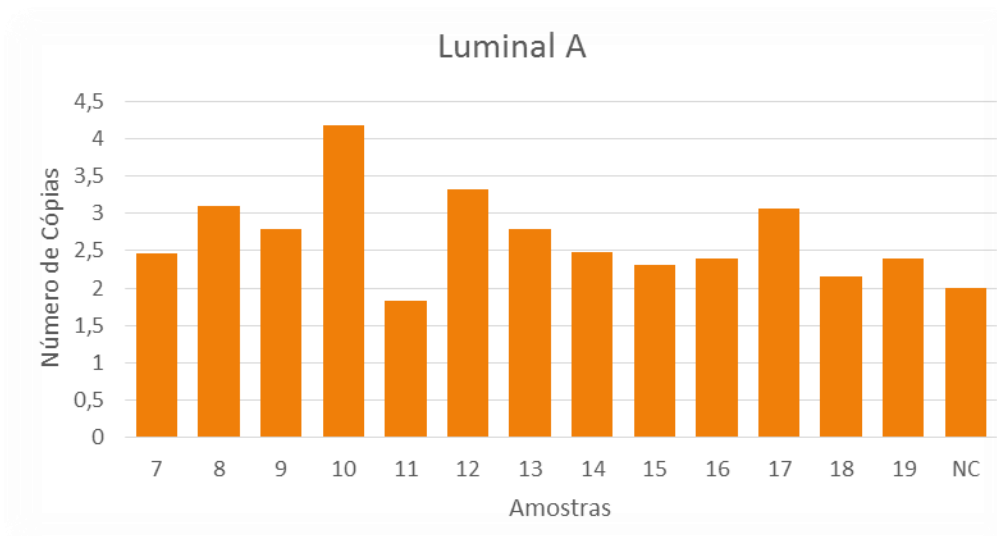


GRÁFICO 3 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL A
 FONTE: A autora (2015)

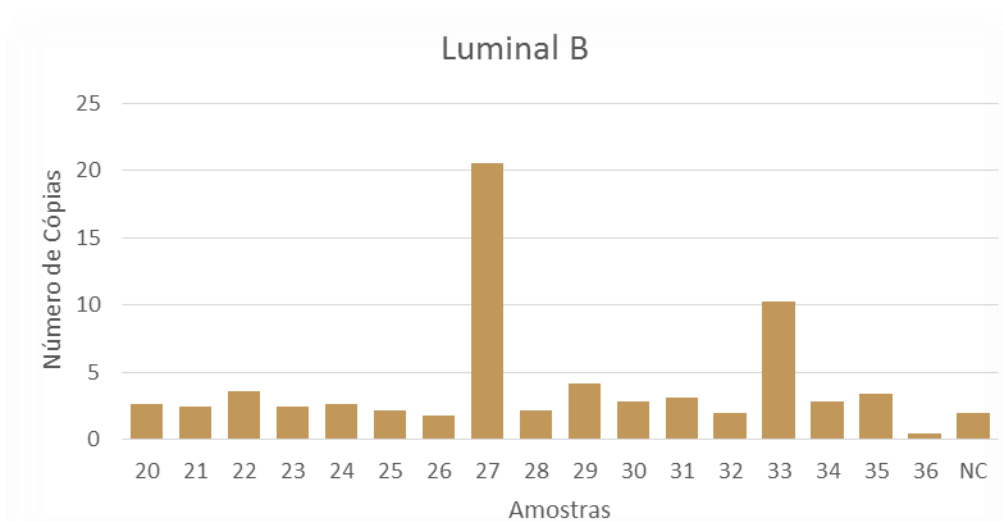


GRÁFICO 4 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO LUMINAL B.
 FONTE: A autora (2015)

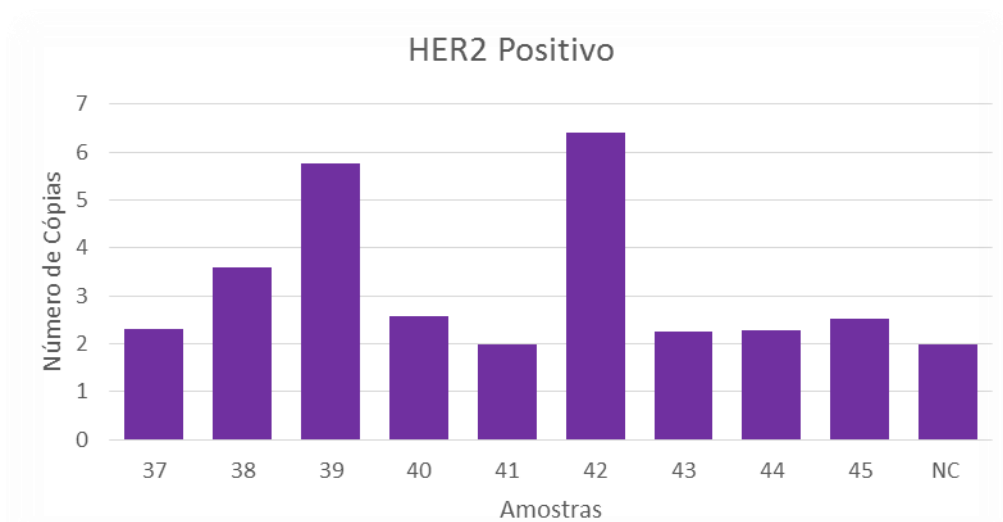


GRÁFICO 5 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DO SUBTIPO HER2+.
 FONTE: A autora (2015)

Os dados referentes à análise do número de cópias do gene *FADD* encontrados nos diferentes subtipos foram submetidos ao Teste de *Kruskal-Wallis* (através do software *GraphPad Prism Version 6.01*) e não apresentaram diferenças significativas ($p= 0,9758$) (GRÁFICO 6).

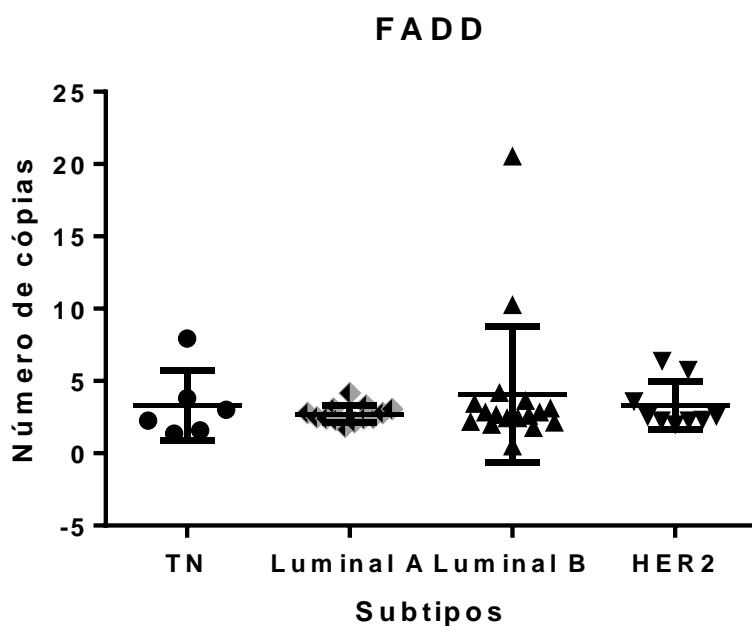


GRÁFICO 6 - ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* DE ACORDO COM OS SUBTIPOS.

FONTE - A autora (2015)

5.2 PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

A fim de verificar se as variações no número de cópias do gene *FADD* estariam relacionadas com os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores foi realizado o teste *t* de *Student* no *software GraphPad Prism Version 6.01* para cada parâmetro selecionado. Foram testados os seguintes parâmetros:

- Idade da paciente;
- Presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares;
- Grau histológico do Tumor.

Em adição a isso o teste *t* de *Student* foi realizado separadamente dentro do grupo amostral de cada subgrupo para cada parâmetro, também no *software GraphPad Prism Version 6.01*.

Como para algumas das amostras não se tinha disponível as informações completas dos parâmetros clínicos e histopatológicos (QUADRO 4), o tamanho amostral (N) variou entre os parâmetros analisados.

5.2.1 Presença e Ausência de Metástase em Linfonodos Axilares

Através do teste *t de Student* verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre a alteração do número de cópias do gene *FADD* em pacientes com carcinomas mamários com presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares ($p= 0,2151$) (GRÁFICO 7).

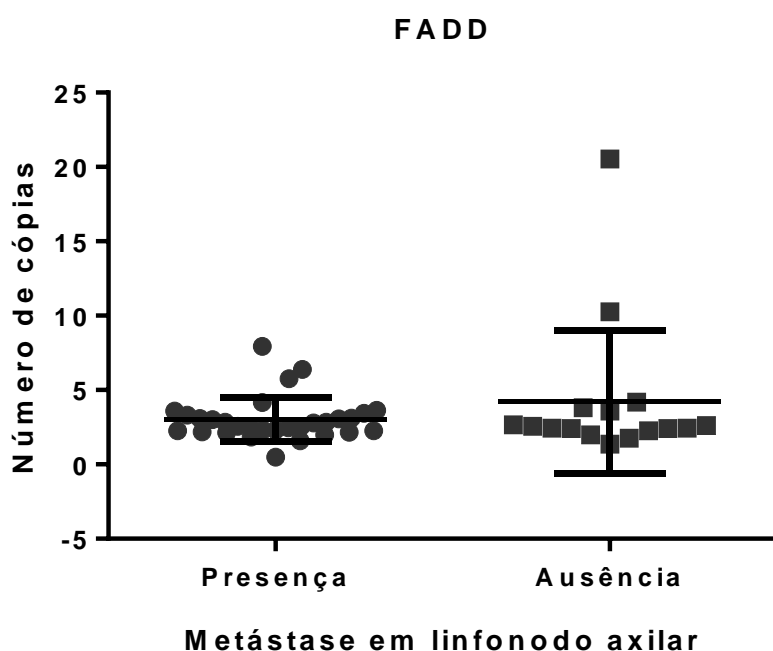


GRÁFICO 7 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM PACIENTES COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE EM LINFONODOS AXILARES. FONTE: A autora (2015)

O teste *t de Student* foi realizado também separadamente para as amostras dos subgrupos Triplo Negativo, Luminal A, Luminal B e HER2+ para o parâmetro presença ou ausência de metástase em linfonodos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa dentro dos subgrupos ($p= 0,4534$; $p= 0,2232$; $p= 0,4784$; $p= 0,8645$ respectivamente).

5.2.2 Grau Histológico do Tumor

Para verificar-se se o grau histológico do tumor está relacionado ao número de cópias do gene *FADD* nos diferentes subtipos, separou-se as pacientes em dois grupos: o primeiro englobava as pacientes que apresentaram graus histológico de I e II e o segundo as que apresentavam grau III. Aplicou-se o teste *t* de *Student* e constatou-se que a diferença no número de cópias entre esses dois parâmetros não é estatisticamente significativa ($p= 0,9199$) (GRÁFICO 8).

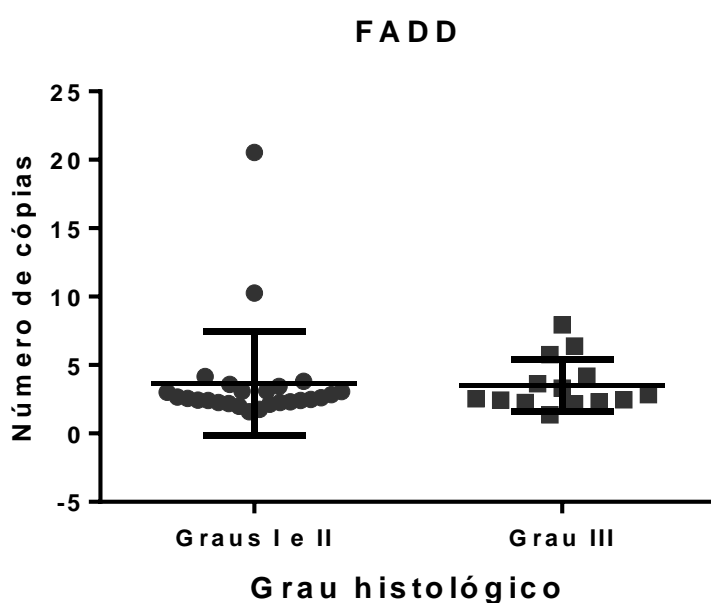


GRÁFICO 8 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *FADD* EM PACIENTES COM TUMORES GRAUS I E II EM RELAÇÃO AOS DE GRAU III.
 FONTE: A autora (2015)

Para analisar se o número de cópias varia entre os graus histológicos do tumor dentro dos subgrupos o teste *t* de *Student* foi aplicado nas amostras dos subgrupos Triplo Negativo, Luminal A, Luminal B e HER2+. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa dentro dos subgrupos ($p= 0,4049$; $p= 0,6731$; $p= 0,6290$; $p= 0,4352$ respectivamente).

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é a quinta causa de morte por câncer em geral correspondendo a 522.000 óbitos, e em mulheres é a causa mais frequente de morte por câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). A taxa de mortalidade por câncer de mama apresenta uma curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 12,10 óbitos/100.000 mulheres em 2012 (valores ajustados pela população mundial) (INCA, 2014). As regiões brasileiras que exibem as maiores taxas de mortalidade são as regiões Sudeste e Sul com respectivamente, 13,61 e 13,42 óbitos/100.000 em 2012 (INCA, 2014). O diagnóstico precoce e a determinação do subtipo do câncer são extremamente importantes para tentar-se selecionar um tratamento efetivo e reduzir a taxa de mortalidade pela doença.

Alguns estudos mostram que a classificação e progressão da doença pode ser melhor entendida utilizando-se o número de cópias em conjunto com os estudos de expressão. O DNA genômico é mais estável que o mRNA e alterações no mesmo podem ser mais facilmente analisadas. Quando estas alterações apresentam valor prognóstico podem ser incluídas na análise inicial (CHIN *et al.*, 2006; BERGAMASCHI *et al.*, 2006).

Nosso estudo mostrou que o gene *FADD* encontra-se com um número de cópias aumentado nos carcinomas primários de mama em relação ao tecido normal de $3,43 \pm 3,1$. Porém, ao se analisar as variações do número de cópias em relação aos diferentes subtipos e aos parâmetros clínicos e histopatológicos a variação entre o número de cópias de *FADD* não apresentou valor representativo, ou seja, esta análise não apresentou potencial de discriminação entre os parâmetros analisados.

A correlação existente entre o número de cópias e a expressão proteica é de maneira global muito baixa, porém alguns genes que se encontram alterados podem afetar algumas vias e processos chave dando assim vantagens de crescimento às células de câncer aneuplóides (GEIGER; COX; MANN, 2010). É possível que o aumento do número de cópias do gene *FADD* tenha conferido em algum momento do processo de carcinogênese uma vantagem às células e por

este motivo encontramos em média um número elevado de número de cópias distribuído por todos os subtipos.

Como o gene *FADD* está em uma região conhecida de amplificação gênica é possível também que ele sofra um processo de co-amplificação em que outros genes possam estar estimulando sua amplificação conjunta (AL-KURAYA *et al.*, 2004; CUNY *et al.*, 2000). Al-Kuraya *et al.* (2004) observaram que as amplificações gênicas refletem um quadro de instabilidade genômica do câncer e que esta instabilidade está relacionada a piores prognósticos no câncer de mama.

O estudo de Geiger, Cox e Mann (2010) verificou em câncer de mama que a expressão proteica de FADD não está relacionada com seu número de cópias. A expressão da proteína FADD por eles encontrada foi muito menor do que o esperado pela amplificação do número de cópias do gene.

Também no nível de expressão de mRNA acreditamos que este aumento de número de cópias observado em *FADD* não é diretamente relacionado à expressão proteica. Em um trabalho em andamento realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Callegari, 2015) foi encontrado um nível de expressão normal do gene *FADD* em carcinomas primários de mama, não havendo correspondência com o aumento do número de cópias.

São muito diversos os mecanismos que podem estar agindo sobre a expressão do DNA genômico, sendo que o nível de regulação pode estar em diferentes etapas seja no nível de transcrição (como por exemplo, metilação do promotor) ou de tradução (como por exemplo, microRNAs). O gene *FADD* em câncer de mama segundo estudo de LIN *et al.* (2015) não é diferencialmente metilado e mesmo assim apresentou uma expressão significativamente diferenciada, o que indica que provavelmente não seja a metilação o fator chave de regulação epigenética que esteja agindo sobre o mesmo. Em relação aos microRNAs, alguns apresentam o mRNA de *FADD* como alvo, podendo se constituir em um dos mecanismos de regulação da expressão proteica. Em macrófagos foi observado que o miR-155 atenua a apoptose das células a partir da regulação do *FADD* mRNA (WANG *et al.*, 2011); em células T Jurkat a indução do miR-128a por desmetilação do DNA levou a resistência à apoptose regulada por FADD (YAMADA *et al.*, 2014); e o hsa-miR-27a leva a uma expressão reduzida de FADD (CHHABRA *et al.*, 2009). A discussão continua em aberto, e

mais estudos se fazem necessários para se compreender a complexidade da regulação do gene *FADD*.

7 CONCLUSÃO

- No grupo amostral analisado o número de cópias do *FADD* não se mostrou associado com os fatores clínicos e histopatológicos e nem com os diferentes subtipos, não apresentando, portanto, a pretendida capacidade de discriminação entre estes grupos.
- Verificou-se que o *FADD* se apresenta com um número de cópias aumentado no tecido tumoral em relação ao tecido normal, contudo isso não é refletido por estudos de expressão de RNAm como o de Callegari, 2015. Isso serve como evidência de que mecanismos complexos agem sobre a regulação da expressão de *FADD* no câncer de mama.
- O número de cópias aumentado deste gene pode também estar relacionado com o quadro de instabilidade genômica que os carcinomas mamários comumente apresentam, no qual vários genes se encontram amplificados.

REFERÊNCIAS

- AL-KURAYA, K. *et al.* **Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer.** *Cancer Research*, v. 64, n. 23, p. 8534–8540, 2004.
- ASHKENAZI, A. *et al.* **Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 104, n. 2, p. 155–162, 1999.
- BELL, B. D. *et al.* **FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 43, p. 16677–16682, 2008.
- BERGAMASCHI, A. *et al.* **Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer.** *Genes Chromosomes and Cancer*, v. 45, n. 11, p. 1033–1040, 2006.
- BHOJANI, M. S.; ROSS, B. D.; REHEMTULLA, A. **TRAIL and Anti-Tumor Responses.** *Cancer Biology & Therapy*, v. 2, n. sup1, p. 70–77, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.205>>.
- CALLEGARI, C. **Análise do número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* em carcinomas primários de mama com e sem metástase em linfonodos axilares,** Tese UFPR, 2015.
- CHEN, G. *et al.* **Phosphorylated FADD induces NF-kappaB, perturbs cell cycle, and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 35, p. 12507–12512, 2005.
- CHHABRA, R. *et al.* **Upregulation of miR-23a~27a~24-2 cluster induces caspase-dependent and -independent apoptosis in human embryonic kidney cells.** *PLoS ONE*, v. 4, n. 6, 2009.
- CHIN, K. *et al.* **Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology.** *Cancer Cell*, v. 10, n. 6, p. 529–541, 2006.

CHINNAIYAN, A. M. *et al.* **Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 4, p. 1754–1759, 2000.

CHINNAIYAN, A. M. *et al.* **FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 9, p. 4961–4965, 1996.

CUNY, M. *et al.* **Relating genotype and phenotype in breast cancer: An analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations.** *Cancer Research*, v. 60, n. 4, p. 1077–1083, 2000.

EHEMAN, C. R. *et al.* **The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004.** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 18, n. 6, p. 1763–1769, 2009.

EROLE, P. *et al.* **Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways.** *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>>.

GEIGER, T.; COX, J.; MANN, M. **Proteomic changes resulting from gene copy number variations in cancer cells.** *PLoS Genetics*, v. 6, n. 9, 2010.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* **Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011.** *Annals of Oncology*, v. 22, n. June, p. 1736–1747, 2011.

GÓMEZ-ANGELATS, M.; CIDLOWSKI, J. A. **Molecular evidence for the nuclear localization of FADD.** *Cell death and differentiation*, v. 10, p. 791–797, 2003.

HUA, Z. C. *et al.* **A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region.** *Immunity*, v. 18, n. 4, p. 513–521, 2003.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2014: Incidências**

de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2014. Acesso em janeiro de 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Atlas da Mortalidade.** Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em: 11/12/2014

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2014. Incidência do Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2014.

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

KABRA, N. H. *et al.* **T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 11, p. 6307–6312, 2001.

KIM, P. K. *et al.* **Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 157, p. 5461–5466, 1996.

NATRAJAN, R. *et al.* **An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers.** *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 121, n. 3, p. 575–589, 2010.

OLDENBURG, R. A. *et al.* **Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 63, p. 125–149, 2007.

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

SANDHU, R. *et al.* **Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy.** *Laboratory Medicine*, v. 41, n. 6, p. 364–372, 2010.

SCAFFIDI, C. *et al.* **Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 164, p. 1236–1242, 2000.

SCAFFIDI, C. *et al.* **Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.** *EMBO Journal*, v. 17, n. 6, p. 1675–1687, 1998.

SCHAUB, F. J. *et al.* **Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells.** *Nature medicine*, v. 6, n. 7, p. 790–796, 2000.

SCHINSKE, K. *et al.* **Abstract 2311: A novel kinase inhibitor of FADD phosphorylation chemosensitizes through the inhibition of NF- κ B.** *Cancer Research*, v. 71, n. 8 Supplement, p. 2311–2311, 2011.

SCHNEIDER, P. *et al.* **TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B.** *Immunity*, v. 7, n. 6, p. 831–836, 1997.

SHEIKH, M. S.; HUANG, Y. **The FADD is going nuclear.** *Cell cycle (Georgetown, Tex.). [S.l.: s.n.]*, 2003

SHERIDAN, J. P. *et al.* **Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 277, n. 5327, p. 818–821, 1997.

SØRLIE, T. *et al.* **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SPRICK, M. R. *et al.* **Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8.** *EMBO Journal*, v. 21, n. 17, p. 4520–4530, 2002.

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. Baltimore, USA. Disponível em: <http://www.hopkinsmedicine.org/avon_foundation_breast_center/breast_cancers_other_conditions/invasive_ductal_carcinoma.html>, 2014. Acesso em janeiro de 2015.

TOMASKOVIC-CROOK, E.; THOMPSON, E. W.; THIERY, J. P. **Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer.** *Breast cancer research : BCR*, v. 11, p. 213, 2009.

TORRESAN, C. **Identificação de Marcadores Moleculares em Metástases de Linfonodos Sentinela Mamários.** p. 166, 2011.

TOURNEUR, L.; BUZYN, A.; CHIOCCHIA, G. **FADD adaptor in cancer.** *Medical Immunology*, v. 4, p. 1, 2005.

TOURNEUR, L.; CHIOCCHIA, G. **FADD: A regulator of life and death.** *Trends in Immunology*, v. 31, n. 7, p. 260–269, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.005>>.

VIRGIN, H. W.; LEVINE, B. **Autophagy genes in immunity.** *Nature immunology*, v. 10, n. 5, p. 461–470, 2009.

WANG, H. Q. *et al.* **Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3.** *Journal of Pathology*, v. 225, n. 2, p. 232–242, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2931/full>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012

YAMADA, N. *et al.* **Epigenetic regulation of microRNA-128a expression contributes to the apoptosis-resistance of human T-cell leukaemia Jurkat cells by modulating expression of Fas-associated protein with death domain (FADD).** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1843, n. 3, p. 590–602, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.022>>.

ZHANG, J.; ZHANG, D.; HUA, Z. **FADD and its phosphorylation.** *IUBMB life*, v. 56, n. 7, p. 395–401, 2004.