



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu

# **ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM CARCINOMAS DE MAMA**

**ANA CAROLINA TOMAZ TAVARES**

**Botucatu - SP**

**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM  
CARCINOMAS DE MAMA

**Mestranda: Ana Carolina Tomaz Tavares**

**Orientadora: Silvia Regina Rogatto**

**Coorientadora: Sandra Aparecida Drigo Linde**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**Botucatu - SP**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Tavares, Ana Carolina Tomaz.

Alterações no número de cópias genômicas em carcinomas de mama / Ana Carolina Tomaz Tavares. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Silvia Regina Rogatto

Coorientador: Sandra Aparecida Drigo Linde

Capes: 20205007

1. Mama - Câncer. 2. Genoma humano. 3. Expressão gênica. 4. Câncer - Prognóstico.

Palavras-chave: Alterações genômicas; CGH array; Câncer de mama.



**Aos meus pais**, que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade. Que se doaram inteiros e que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos pelos filhos. Com imensa gratidão e amor.

---

*Agradecimentos*



*À minha orientadora Dra. Silvia Regina Rogatto*

Cujo coração é tão grande quando sua competência científica, agradeço pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e por 2 anos de aprendizado. Aprendizado científico, acadêmico, ético e moral. De tudo o que levarei, este com certeza será o meu maior orgulho. Obrigada por todas as broncas, os conselhos e os ensinamentos, que me fizeram a cada dia, uma pessoa melhor.

*À minha coorientadora Dra. Sandra Aparecida Drigo Linde*

Obrigada pela paciência e toda a ajuda essenciais para a realização desse projeto.

**“Ensinar é um exercício de imortalidade, que de alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra, sendo que, desse modo, o professor não morre jamais, estando a cada dia no pensamento daqueles a quem ensinou.”**

**(Rubem Alves)**

---

*A Deus*

Pela certeza de cada dia estar no lugar e com as pessoas que deveria. Pelas oportunidades que me foram concedidas, amizades que levarei para toda a vida, pelas dificuldades encontradas pelo caminho que me fizeram crescer, pelos erros que me fizeram aprender, pelos acertos que me alegraram e por durante todo o tempo poder contar Contigo.

*Aos meus pais Ademar e Ivonete e meus irmãos Gustavo (in memoriam) e Otavio*

Que sempre acreditaram em mim, que iluminaram os meus caminhos com afeto e dedicação. Pelo apoio constante e amor incondicional. Pela compreensão nos momentos em que não estive presente. Pelo incentivo, amizade, paciência e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. Amo muito vocês!

**Família. [Do lat. familia] S.f. 1. Duas ou mais pessoas que cultivam a arte de conviver.**

**2. Grupo de pessoas tão iguais e tão diferentes que se amam, se desentendem, fazem as pazes e que se completam.**

*Ao meu noivo Osvair*

Pelo amor, confiança, apoio e companheirismo. Por me ouvir e me ajudar sempre. Pela preocupação e zelo presentes em todos os momentos. Te amo!

**“O amor não magoa, o amor ajuda  
O amor perdoa, o amor nos muda”**

**Plínio Oliveira**

---



***Aos colegas André, Fabio e Sara***

Pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Sem vocês, isso não seria possível!  
Muito Obrigada!!

***A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório Neogene: Julia, Renata, Larissa, Maísa, Tatiane, Márcio, Patrícia, Naiara, Natália, Tainara, Jovita, Talita, Cadu, Hellen, Mateus, Juan, Deborah, Priscila, Marco, Vanessa, Andréia, Graziela, Rogério, Fernanda Fortes, Márcia, Ana, Ariane, Sandra, Fernanda, Francine, Cássia, Rodrigo, Fabíola, Luciana e Georgina.***

Obrigada pela recepção calorosa e por tornarem valiosos todos os momentos. Por toda a ajuda, pelos cuidados, pelas conversas, pelas risadas... Obrigada por me permitirem fazer parte do seu rol de amigas!

***Ao quarteto fantástico, Juliana Marino, Karine, Juliana Giusti e Cecília.***

Que fizeram com que cada minuto em Botucatu valesse a pena. Mesmo quando cada uma estava em uma parte do mundo... Obrigada por participarem de cada momento, por trilharem comigo esse caminho, mostrando-me que nunca estive sozinha.

**“As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é  
infindável.”**

**Madre Teresa de Calcutá**

***Ao Programa de pós-graduação em genética***

Pelo ensino e formação de excelência. E por estarem sempre prontos a ajudar, muito  
obrigada!

***A CAPES***

pelo fornecimento da bolsa de estudos que garantiu o apoio financeiro necessário à realização desta dissertação de mestrado.

---



“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

---



O câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea em relação às alterações moleculares, composição celular e evolução clínica. Pacientes com características clínicas e histopatológicas semelhantes podem apresentar prognósticos distintos. Análises de alterações genômicas em larga escala têm contribuído para identificar regiões e genes associados com os vários estágios da tumorigênese mamária. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de alterações no número de cópias genômicas por Hibridação Genômica Comparativa baseada em arrays (aCGH), utilizando a plataforma 4x180K (Agilent Technologies) em 53 carcinomas ductais invasivos (CDI) primários. Os CDI apresentaram 3.849 alterações genômicas, com semelhante proporção de perdas e ganhos genômicos (1.622 e 1.731, respectivamente), 444 ganhos em alto nível (12%) e 52 perdas homozigotas (1%). Foram identificadas 19 alterações genômicas significativamente recorrentes presentes em mais de 20% dos tumores. Foram detectadas perdas em 1p36.32, 8p23.3, 8p23.1, 8p11.23, 11q25, 14q11.1-q11.2, 16q23.3, 16q24.1 e 18q23; e ganhos em 1q21.1, 1q21.2, 1q22, 1q32.1, 1q42.3, 1q44, 8q24.21 e 15q11.2. As alterações mais prevalentes foram ganhos em 8q24.21 (36%) e 1q44 (32%), e a perda em 8p11.23 (28,3%). Ganhos em 1q21.1-1q21.2 foram associados com tumores negativos para o receptor de estrógeno (ER-) ( $P=0,016$ ). Perda em 8p23.1 foi associada com um maior tempo de sobrevida livre de doença ( $P=0,027$ ) e perda em 8p23.3 com tumores HER2+ ( $P=0,033$ ) e Ki67 alto ( $P=0,036$ ). Ganho em 8q24.21 foi associado com menor risco de acometimento de linfonodos ( $P=0,0199$ ). A perda em 14q11.1-q11.2 associou-se com características de maior agressividade tumoral, como grau III ( $P=0,0147$ ), Ki67 alto ( $P=0,0096$ ) e pior evolução clínica, desenvolvimento de metástase ( $P=0,0375$ ). Perda em 18q23 foi associada com tumores negativos para o receptor de progesterona (PR-) ( $P=0,0065$ ). A análise dos perfis de alterações genômicas de acordo com status dos receptores ER, PR e HER2, acometimento linfonodal (LN) e desenvolvimento de metástases à distância (MD)

---

identificaram alterações exclusivas de acordo com a presença ou ausência dessas características revelando perfis genômicos de pior prognóstico. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado permitiu verificar a separação dos CM em dois grupos: *cluster 1* (22 casos) e *cluster 2* (31 casos), apresentando padrões de alterações distintos como ganhos significativos em 3q, 8q, 11q, 17q, 19q e 20q e perdas em 4q, 8p, 15q e 16q. Ganhos genômicos em 8p11.21-q24.3 (aproximadamente 2 Mb) foram detectados exclusivamente no *cluster 2* e estavam presentes em mais de 50% dos casos. A comparação entre os *clusters* e características clínicas e histopatológicas revelou associação entre o *cluster 2* e características de pior prognóstico (Ki67 alto e grau III), enquanto o *cluster 1* foi associado com tumores de baixo risco (Grau I-II; Ki67 -/baixo e ER+) (P=0,0122). Em especial, ganhos em 12p13.2 exclusivos dos tumores triplo negativos, já foram relatados em outros estudos, corroborando sua importância como alvo para o delineamento de terapias alvo. O presente estudo revelou candidatos a biomarcadores que podem ser úteis na prática clínica contribuindo para a avaliação prognóstica e de resposta a terapias.

---



Breast cancer (BC) is a heterogeneous both at molecular and clinical level. Patients with similar clinical and histopathological findings can present different prognosis. Analysis of large scale genomic changes have helped to identify regions and genes associated with the various stages of mammary tumorigenesis. The present study aimed to evaluate the genomic profile by Comparative Genomic Hybridization array-based (aCGH), using the platform 4x180K (Agilent Technologies) in 53 primary invasive ductal carcinomas (IDC). The IDC showed 3849 genomic alterations, with similar proportion of genomic gains and losses (1,622 and 1,731, respectively), 444 alterations were found with high copy number gains (12%) and 52 homozygous losses (1%). We were identified 19 significantly recurrent genomic alterations in more than 20% of tumors. Losses were detected at 1p36.32, 8p23.3, 8p23.1, 8p11.23, 11q25, 14q11.1-q11.2, 16q23.3, 16q24.1 and 18q23, and gains at 1q21.1, 1q21.2, 1q22, 1q32.1, 1q42.3, 1q44, 8q24.21 and 15q11.2. The most frequent alterations were gains at 8q24.21 (36%) and 1q44 (32%), and losses at 8p11.23 (28.3%). Gains in 1q21.1-1q21.2 were associated with negative estrogen receptor (ER-) ( $P = 0.016$ ) tumors. Loss on 8p23.1 was associated with longer disease-free survival ( $P = 0.027$ ). Losses on 8p23.3 were associated with HER2 + tumors ( $P = 0.033$ ) and high level of Ki67 ( $P = 0.036$ ). Gain at 8q24.21 was associated with lower risk of lymph node involvement ( $P = 0.0199$ ). Loss at 14q11.1-q11.2 was associated with more aggressive tumor characteristics such as grade III ( $P = 0.0147$ ), high level of Ki67 ( $P = 0.0096$ ) and worse clinical outcome, with metastasis development ( $P = 0.0375$ ). Loss at 18q23 was associated with progesterone receptor negative (PR-) ( $P = 0.0065$ ) tumors. The comparison of the genomic alterations according to receptor status ER, PR and HER2, lymph node involvement (LN) and development of distant metastases (DM) revealed significant alterations associated with worse prognosis. Unsupervised hierarchical clustering analysis revealed two clusters: cluster 1 (22 cases) and cluster 2 (31 cases), with distinct genomic alterations involving

---



gains in 3q, 8q, 11q, 17q, 19q and 20q, and losses in 4q, 8p, 15q and 16q. Genomic gains in 8p11.21-q24.3 (~ 2 Mb) were detected exclusively in the cluster 2 in more than 50% of the cases. The comparison between the clusters and clinical and histopathological characteristics revealed an association between the cluster 2 and worse prognosis features (high level of Ki67 and grade III), while the cluster 1 was associated with better prognosis (Grade I-II; Ki67 negative / low and ER +) (P = 0.0122). In particular, gains on 12p13.2 were detected exclusively in triple-negative tumors. This alteration has been reported in other studies corroborating its importance as a target for therapy in BC. This study revealed putative biomarkers that may be useful for clinical practice contributing in the prognostic evaluation and response to therapy.

---



*Lista de Figuras*

---

<b>Figura 1</b>	Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 53 casos de CDI avaliados pela técnica de CGH-array.....	35
<b>Figura 2</b>	Ideograma ilustrando a distribuição das alterações genômicas detectadas nos 53 CDI avaliados pela técnica de CGH-array em todo o conjunto cromossômico (chr1-chr22).....	36
<b>Figura 3</b>	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com as alterações genômicas A) 8p23.1 (perda); B) 8q24.21 (ganho) e C) 14q11.1-q11.2 (perda). Valores de P foram determinados por log-rank test .....	42
<b>Figura 4</b>	Comparação do perfil genômico dos 52 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao status do receptor de estrogênio (ER).....	45
<b>Figura 5</b>	Comparação do perfil genômico geral para 52 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao status do receptor de progesterona (PR).....	48
<b>Figura 6</b>	Comparação do perfil genômico geral em 49 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao status do HER2.....	54
<b>Figura 7</b>	Comparação do perfil genômico de acordo com o padrão imunoistoquímico triplo-negativo (ER-, PGR- e HER2-) em relação às demais amostras com pelo menos um dos três biomarcadores presentes para todo o conjunto cromossômico.....	56
<b>Figura 8</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes nos casos CDI com relação a acometimento linfonodal (n=53) avaliados por CGH-array.....	59

---

<b>Figura 9</b>	Comparação do perfil genômico de acordo com presença (MD+) ou ausência de metástase à distância (MD-) para todo o conjunto cromossômico.....	63
<b>Figura 10</b>	Comparação do perfil genômico em 33 casos de carcinomas ductais invasivos de mama (CDI) quanto ao comprometimento de linfonodos e metástases a distância (LN+/Met+) e com linfonodos comprometidos na ausência de metástases a distância (LN+/MD-).....	66
<b>Figura 11</b>	Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado realizada nas 53 amostras de CDI baseada no perfil de alterações genômicas encontrado em cada caso.....	69
<b>Figura 12</b>	Representação gráfica da comparação do padrão de alterações genômicas para cluster 1 (22 casos) e cluster 2 (31 casos).....	70

---



*Lista de Tabelas*

---

<b>Tabela 1</b>	Resumo dos principais estudos que identificaram alterações genômicas em carcinomas de mama.....	16
<b>Tabela 2</b>	Características clínicas e histopatológicas das pacientes com carcinoma de mama incluídas na análise de aCGH.....	27
<b>Tabela 3</b>	Regiões genômicas alteradas recorrentes entre os 53 casos de carcinoma ductal invasivo.....	38
<b>Tabela 4</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes nos carcinomas ductais invasivos ER negativos (n=17) em relação aos casos ER positivos (n=35) avaliados por CGH-array.....	44
<b>Tabela 5</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes nos CDI que eram PR negativos (n=28) em relação aos casos PR positivos (n=24) avaliados por CGH-array.....	47
<b>Tabela 6</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes nos carcinomas mamários HER2 positivos (n=7) em relação aos casos HER2 negativos (n=42) avaliados por CGH-array.....	50
<b>Tabela 7</b>	7- Alterações genômicas exclusivas observadas nos casos triplo-negativos (n=10) e nos demais casos com pelo menos um dos três biomarcadores presentes (n=43).....	55
<b>Tabela 8</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes nos casos CDI com relação a acometimento linfonodal (n=53) avaliados por CGH-array.....	58
<b>Tabela 9</b>	Alterações genômicas exclusivas em pacientes com carcinoma mamário de acordo com a presença ou ausência de metástase à distância.....	61

---

<b>Tabela 10</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes nos carcinomas ductais invasivos LN+/MD+ (n=11) em relação aos casos LN+/MD- (n=22) avaliados por CGH-array.....	65
<b>Tabela 11</b>	Alterações envolvidas em ganhos no cromossomo 8 exclusivas do cluster 2 presentes nos carcinomas ductais invasivos.....	71



*Lista de Siglas  
e Abreviaturas*



<b>aCGH</b>	<b>Hibridação Genômica Comparativa Baseada em Arrays</b>
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>BAC</b>	<b>Cromossomo artificial de bactéria</b>
<b>CDI</b>	<b>Carcinoma ductal invasivo</b>
<b>CISH</b>	<b>Hibridação <i>in situ</i> Cromogênica</b>
<b>CM</b>	<b>Câncer de mama</b>
<b>CNA</b>	<i>Copy Number Alteration</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation</i>
<b>DGV</b>	<i>Database of Genomic Variants</i>
<b>ER</b>	<b>Receptor de Estrógeno</b>
<b>FISH</b>	<b>Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência</b>
<b>HER2</b>	<b>Receptor do fator de crescimento epidérmico humano</b>
<b>HT</b>	<b>Hormonioterapia</b>
<b>IHQ</b>	<b>Imunoistoquímica</b>
<b>INCA</b>	<b>Instituto Nacional do Câncer</b>
<b>LN</b>	<b>Linfonodo</b>
<b>LOH</b>	<b>Perda de heterozigose</b>
<b>LR-PCR</b>	<b>LongRange PCR</b>
<b>MD</b>	<b>Metástase à distância</b>
<b>mRNAseq</b>	<b>Sequenciamento de alto desempenho de RNAs mensageiros</b>
<b>NCCN</b>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<b>OMS</b>	<b>Organização Mundial de Saúde</b>
<b>PR</b>	<b>Receptor de Progesterona</b>
<b>qPCR</b>	<b>PCR quantitativa em tempo real</b>

---

<b>RA</b>	<b>Receptores de Andrógeno</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>RT-PCR quantitativa em tempo real</b>
<b>SBR</b>	<b>Scarff, Bloom e Richardson</b>
<b>SCC</b>	<b>Sobrevida câncer-específica</b>
<b>SLD</b>	<b>Sobrevida livre de doença</b>
<b>SNP</b>	<b>Polimorfismos de nucleotídeo único</b>
<b>TEM</b>	<b>Transição epitélio-mesênquima</b>
<b>TN</b>	<b>Triplo-negativos</b>
<b>TNM</b>	<b>Classificação de Tumores Malignos</b>
<b>UICC</b>	<b>União Internacional Contra o Câncer</b>

---



---

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>Epidemiologia</b> .....	<b>2</b>
<b>Fatores de Risco</b> .....	<b>3</b>
<b>Fatores Prognósticos</b> .....	<b>5</b>
<b>Aspectos histopatológicos dos CM</b> .....	<b>9</b>
<b>Hibridação Genômica Comparativa Baseada em Arrays</b> .....	<b>13</b>
<b>Alteração no número de cópias genômicas identificadas por aCGH em carcinomas mamários</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<i>Objetivo Geral</i> .....	<b>24</b>
<i>Objetivos Específicos</i> .....	<b>24</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>Pacientes e amostras</b> .....	<b>26</b>
<b>Extração de DNA</b> .....	<b>28</b>
<b>CGH-Array (<i>Array-Based Comparative Genomic Hybridization</i>)</b> .....	<b>29</b>
<b>Marcação das Amostras</b> .....	<b>29</b>
<b>Hibridação e Lavagem</b> .....	<b>30</b>
<b>Extração e Análise dos Dados de CGH-array</b> .....	<b>30</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>Análise do número de cópias genômicas em carcinomas de mama</b> .....	<b>33</b>
<b>Alterações genômicas recorrentes em Carcinomas Ductais Invasivos</b> .....	<b>33</b>
<b>Comparação entre as alterações genômicas e as características clínico-patológicas</b> .....	<b>43</b>
<i>Receptor de estrógeno</i> .....	<b>43</b>
<i>Receptor de progesterona</i> .....	<b>46</b>
<i>Fator de crescimento epidérmico humano</i> .....	<b>49</b>
<i>Amostras triplo-negativas</i> .....	<b>55</b>
<i>Acometimento linfonodal</i> .....	<b>57</b>
<i>Desenvolvimento de metástase à distância</i> .....	<b>60</b>
<i>Comparação de tumores linfonodo+/metástase+ versus linfonodo+/metástase-....</i> .....	<b>64</b>

---

<b>Análise de agrupamentos baseada no padrão de alterações genômicas .....</b>	<b>67</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>103</b>

---



# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia

O câncer é definido por um conjunto de mais de 100 doenças cujo crescimento celular é desordenado, invadindo tecidos e órgãos e podendo se espalhar (metástase) para outras regiões do corpo. Devido ao crescente número de casos, o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial. Uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê para o ano de 2030, 27 milhões de casos desta doença, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (INCA, 2013).

Em 2008, cerca de 1.384.000 mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama (CM) no mundo (Ferlay et al., 2010). Sem considerar o câncer de pele não-melanoma, esse total representou quase um quarto (23%) de todos os cânceres invasivos diagnosticados entre as mulheres em 2008 (Youlden et al., 2012). Com exceção da China e Vietnã, de alguns países da África Oriental e Ocidental, bem como partes da América Central e do Sul e do Sul da Ásia, o CM teve a maior incidência entre as mulheres no mundo, se comparado com qualquer outro tipo de câncer (Youlden et al., 2012). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CM é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. No Brasil, desconsiderando os tumores da pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres em todas as regiões, com exceção da região Norte, onde ocupa a segunda posição. Em 2013, espera-se, para o Brasil, aproximadamente 53.000 casos novos de câncer da mama.

---

Uma parcela significativa dos carcinomas mamários tem bom prognóstico se diagnosticado e tratado precocemente. A metástase é a principal causa de morte sendo as mais comuns as regionais e em linfonodos axilares e à distância, as metástases no fígado, pulmão ou osso (Sellinger et al., 2011). A sobrevida média mundial após cinco anos é de 61%. Segundo o Ministério da Saúde e o INCA, em 2010, 12.705 mulheres morreram em decorrência do CM no Brasil, onde as taxas de mortalidade associadas à doença continuam elevadas, em parte como resultado do diagnóstico tardio. Uma das causas do atraso ao diagnóstico pode ser o reflexo da inexistência de uma política consistente de controle da doença que tem na mamografia o seu instrumento fundamental (Abreu & Koifman, 2002; INCA, 2013).

## **1.2 Fatores de Risco**

O CM é considerado um problema de saúde pública, que afeta todos os países, observando-se aumento significativo em sua incidência e mortalidade. Esse aumento pode estar relacionado às alterações nos hábitos reprodutivos, como postergação do parto e mudanças nutricionais, uma vez que a obesidade eleva o risco do CM na pós-menopausa (Gebrim & Quadros, 2006). Antes dos 35 anos de idade, é considerado relativamente raro, no entanto, acima dessa faixa etária a incidência aumenta progressivamente. O número de casos de CM em mulheres com idade inferior aos 40 anos vem aumentando consideravelmente (INCA, 2013).

Há vários fatores de risco associados à doença, alguns bem estabelecidos e uma variedade de outros ainda em estudo. Dentre eles pode-se citar: história familiar (fator genético), densidade mamográfica, histologia das lesões benignas, exposição à radiação ionizante, exposição excessiva a hormônios, dieta, entre outros fatores relacionados ao

---



estilo de vida, como consumo de álcool, cigarro, status socioeconômico e agentes ambientais.

História familiar de câncer de mama e ovário ocorre em aproximadamente 10% dos casos de CM e está relacionado com a presença da doença em idade jovem; parentes afetados em gerações sucessivas; dois ou mais parentes de primeiro grau com diagnóstico da doença no período da pré-menopausa; casos de CM bilateral e casos de CM em homens. A ocorrência de pelo menos uma dessas características sugere a presença de um componente genético hereditário de predisposição à doença. Em indivíduos com risco aumentado de câncer familiar, as intervenções preventivas podem incluir recomendações, tais como: mudanças de estilo de vida; realização de exames periódicos iniciando em idade mais jovem com intuito de detecção precoce do câncer; o uso de quimioprevenção; e para aqueles em maior risco, cirurgias profiláticas (para revisão Scheuner et al., 2010).

Os genes *BRCA1* (17q21) e *BRCA2* (13q12.3) foram os primeiros genes de predisposição altamente penetrantes descritos em pacientes com história familiar de câncer de mama e ovário (Shuen & Foulkes, 2011). Desde então, têm sido utilizados testes genéticos, incluindo a triagem de mutações nestes genes, em famílias clinicamente caracterizadas como portadoras da Síndrome de Câncer de Mama e Ovário (Narod & Foulkes, 2004). Além de *BRCA1* e *BRCA2*, outros genes considerados de alta penetrância na predisposição ao CM já foram relatados, como *PTEN* e *TP53*. Genes com penetrância moderada também são conhecidos, tais como *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1* e *PALB2* (Zhang et al., 2011).

---

### 1.3 Fatores Prognósticos

Na prática clínica, o prognóstico das pacientes com CM é avaliado segundo o acometimento de linfonodos axilares, tamanho e estadiamento tumoral, grau e subtipo histológico, idade da paciente, status dos receptores hormonais estrógeno e progesterona (ER e PR, respectivamente), do receptor do fator de crescimento epidérmico (ERBB2/HER2) assim como da medida de proliferação celular (Ki67).

A realização do mapeamento e da ressecção do linfonodo sentinela no estadiamento cirúrgico da axila clinicamente negativa é recomendada pelas Diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para avaliação do status patológico do linfonodo axilar em pacientes com CM em estadio clínico I ou II. Um estudo multicêntrico randomizado de fase III foi realizado em 5.611 pacientes divididas em dois grupos, onde ambos fizeram biópsia do linfonodo sentinela, porém em um grupo foi realizado esvaziamento axilar somente se positivo na biópsia, ao passo que no outro grupo a dissecação foi feita independentemente do resultado da biópsia. Os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferença significativa na sobrevida livre de doença, controle regional ou sobrevida global das pacientes, portanto estes dados sugerem que a cirurgia sem o esvaziamento axilar é uma terapia adequada, segura e eficaz para pacientes com CM com linfonodos negativos (Krag et al., 2010).

O fator prognóstico mais informativo é o acometimento dos linfonodos axilares, sendo que o prognóstico piora de acordo com o aumento de linfonodos envolvidos. Pacientes com quatro ou mais linfonodos positivos são consideradas como um subgrupo de prognóstico desfavorável (Faneyte et al., 2004; Clarke et al., 2005). Todavia, há relatos de que este não é um indicador completamente preciso, uma vez que 25% das pacientes linfonodo-negativas possuem micrometástases e desenvolvem recorrência, ao passo que

---

50% das pacientes linfonodo-positivas não apresentam recidivas mesmo sem tratamento adjuvante após vários anos de seguimento (Duffy, 2005). Garcia Fernandez et al. (2013) relataram que pacientes linfonodo-negativas e positivas não diferiram significativamente com relação a recidivas locais e à distância, intervalo livre de doença e mortalidade, com seguimento de mais de 4 anos.

O estadiamento do CM é baseado na classificação clínica proposta pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) de 2004, sendo referida como classificação TNM (Classificação de Tumores Malignos), na qual “T” refere-se ao tamanho do tumor primário, “N” à presença ou ausência de metástases para linfonodos regionais e “M” é atribuído para a presença ou ausência de metástases à distância. Deve-se levar em consideração que esta classificação aplica-se apenas aos carcinomas, sendo indispensável a confirmação histológica. Na presença de múltiplos tumores, o maior deles é considerado para definição dos parâmetros e quando houver tumores sincrônicos bilaterais a classificação de cada um deles deve ser isolada (INCA, 2013).

Segundo os parâmetros de classificação histológica de CM de Scarff, Bloom e Richardson (SBR), mais comumente utilizado, os tumores classificados como grau I (bem diferenciados) apresentam prognóstico favorável, de grau II (moderadamente diferenciados) apresentam prognóstico intermediário e de grau III (fracamente diferenciados) apresentam pior prognóstico.

Em vigência desde janeiro de 2011, o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) introduziu uma revisão do Manual do Estadiamento do Câncer que contém alterações importantes no sistema de estadiamento TNM para o CM. A recomendação é que todos os cânceres invasivos recebam uma classificação combinada da histologia do tumor usando o sistema de graduação do tumor de SBR com modificação de Elston-Ellis (Elston & Ellis, 1991), com esclarecimento da classificação de células tumorais isoladas no

---

estadiamento do linfonodo axilar, subdividindo o estadio I em estadio IA e IB, mediante presença ou ausência de micrometástases nodulares (N0 versus N0mi+), e definição de uma nova categoria de doença M0 (i+) que se refere às células tumorais detectáveis na medula óssea ou células tumorais circulantes ou encontradas incidentalmente em outros tecidos, porém que não excedam 0,2mm. Esta edição também recomenda a inclusão dos fatores prognósticos incluindo o grau do tumor, perfil de expressão do ER, PR e status HER2, embora essas características não influenciem de modo específico o estadio da doença.

A expressão dos receptores de estrógeno e progesterona detectada por imunohistoquímica (IHQ) é utilizada na rotina clínica como fator prognóstico e preditivo, definindo, então, a resposta ao tratamento do CM com hormonioterapia (HT), devido ao papel central da proteína ER na sinalização de estrogênio. Há dois receptores de estrógeno descritos em literatura, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , os quais, mesmo traduzidos a partir de genes localizados em cromossomos diferentes e exibindo funções fisiológicas distintas, partilham um alto grau de homologia, principalmente no seu domínio de ligação ao DNA. Os dois receptores têm 98% de identidade na região central de ligação ao DNA, contudo diferem muito nos seus domínios de ativação (menos de 15% de homologia), sugerindo que podem recrutar diferentes coativadores, alterando assim, os seus efeitos específicos de transcrição (Zhao et al., 2008; Le Romancer et al., 2011). A correlação entre o status do ER em tumores de mama e os dados clínicos é baseada na avaliação do ER $\alpha$ , uma vez que o papel específico de ER $\beta$  em CM ainda é pouco conhecido, mas o seu impacto em várias formas de resistência ao tratamento tem sido altamente questionado (Honma et al., 2008; Rosa et al., 2009; Le Romancer et al., 2011). Os resultados da análise da expressão ER $\alpha$  são usados para a predição da resposta à terapia endócrina, entretanto, em aproximadamente 50% dos tumores, essa resposta é imperfeita (Osborne, 1998; Clarke et al., 2003). Portanto, muitos

---

tumores ER+ são resistentes ao tamoxifeno sem qualquer exposição anterior ao medicamento. Além disso, muitos desses tumores que responderam inicialmente ao tamoxifeno podem adquirir resistência durante e após a terapia (Murphy et al., 2011). Devido a essa variabilidade, é importante caracterizar alterações genômicas associadas com o carcinoma mamário.

A amplificação do gene *HER2/ERBB2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*, aliases: *CD340*, *HER-2*, *HER-2/neu*, *MLN 19*, *NEU*, *NGL*, *TKR1*) com consequente aumento de expressão da proteína na superfície da célula tumoral, é relatado em 20% dos CM e está relacionada a um pior prognóstico (Caldarella et al., 2013). *HER2/ERBB2* é um proto-oncogene que codifica um receptor para tirosina quinase e está envolvido em várias vias reguladoras da proliferação, invasão, sobrevivência e motilidade celular (para revisão Corben et al., 2013). O aumento da expressão deste gene é um fator preditivo ao tratamento com o anticorpo monoclonal Trastuzumabe, o qual se liga à porção extracelular da proteína HER2, impedindo a sua dimerização e, conseqüentemente, interrompendo a transdução de sinal e o crescimento celular. Como consequência, verifica-se o aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes, tanto na doença localizada quanto na metastática (Benson et al., 2009). O aumento da expressão da proteína HER2 é detectado por IHQ ou pela constatação da amplificação gênica, identificada pela metodologia de FISH – (Hibridação *in situ* por Fluorescência) ou CISH – (Hibridação *in situ* Cromogênica) (Rosa et al., 2009; para revisão, Rosa et al., 2013).

No início da década de 80, Gerdes et al. identificaram o antígeno Ki67 utilizando um anticorpo monoclonal de ratos contra um antígeno nuclear a partir de uma linhagem celular derivada de linfoma de Hodgkin. O anticorpo Ki67 reconhece um antígeno nuclear presente em células em proliferação, mas ausente em células em repouso, e, portanto, tem sido utilizado como um marcador de proliferação celular. Em geral, as análises de Ki67 são

---

realizadas por imunistoquímica em tecidos fixados em parafina e os escores utilizados se baseiam na porcentagem de células marcadas pelo anticorpo. Embora, os *cut-offs* para os diferentes escores utilizados em cada estudo variem consideravelmente, o Consenso Internacional St Gallen (2011) recomendou o uso de um *cut-off* de 14% de Ki67 em células positivas para distinção dos subtipos Luminal A (melhor prognóstico; <14% de células) e Luminal B (pior prognóstico, > 14%) (revisado em Gonçalves et al, 2012). Tecido de mama normal expressa baixos níveis de Ki67 (<3%) e está associado com expressão de ER, uma vez que células mamárias normais ER+ não proliferam. No entanto, não ocorre necessariamente essa associação entre os tumores com positividade de ER e baixa proliferação celular. Há também relatos da associação entre tumores de alto grau (III) e Ki67 >14%. O uso de Ki67 como um marcador prognóstico e preditivo no CM tem sido amplamente investigado. Há evidências crescentes de que Ki67 alto é um marcador de pior prognóstico associado com diminuição de sobrevida livre de doença e sobrevida global. Com relação à resposta ao tratamento neoadjuvante e adjuvante, os dados em literatura ainda são contraditórios. Alguns relatos sugerem que pacientes com tumores apresentando Ki67-baixo podem ser beneficiados por tratamento neoadjuvante hormonal. Quanto ao tratamento adjuvante, tumores com alta expressão de Ki67 responderiam melhor ao tratamento com taxano e letrozol (para revisão Yerushalmi et al., 2010; Strand et al., 2013).

#### **1.4 Aspectos histopatológicos dos CM**

O tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal, que pelo próprio nome, acomete as células ductais mamárias. O carcinoma lobular afeta os lóbulos da mama, e é observado em aproximadamente 30% dos casos, sendo comum a apresentação bilateral. O

---

carcinoma inflamatório é mais raro e normalmente se apresenta de forma agressiva, comprometendo toda a mama, podendo causar rubor, edema e calor locais.

Os carcinomas de mama *in situ* não ultrapassam as primeiras camadas dos ductos e os invasivos invadem os tecidos ao redor (Polyak, 2001). O carcinoma ductal invasivo é o tipo histológico mais comum e heterogêneo compreendendo aproximadamente 75% dos CM invasivos. Existem ainda 16 subtipos de carcinomas epiteliais mais raros, como o carcinoma apócrino, cribiforme, micropapilar, entre outros (para revisão, Corben, 2013). A diversidade no aspecto clínico do câncer de mama é indubitavelmente relacionada a diferenças nas taxas de crescimento do tumor, invasão tumoral, potencial metastático e outros sinais complexos de crescimento celular e sobrevivência (Chang et al., 2005).

Estudos moleculares em tumores de mama esporádicos têm sido realizados há mais de 20 anos. Estes estudos demonstraram que o CM é uma doença heterogênea em relação às alterações moleculares, composição celular e resultados clínicos (Joosse et al., 2011). Muitas vezes há uma grande heterogeneidade, mesmo entre os pacientes com características clínicas e patológicas semelhantes (Wang et al., 2011).

Estudos moleculares avaliando o perfil de expressão gênica em larga escala em plataformas de *microarray* detectaram cinco subtipos de CM, sendo eles: Luminal A, Luminal B, *ERBB2*, *Basal-like*, e *Normal Breast-like*. Marcadores imunoistoquímicos são muitas vezes utilizados para classificar os subtipos de CM em tumores do tipo luminal, que são predominantemente ER-positivo (ER+), e *basal-like* que são ER-negativos (ER-), PR- e HER- (Carey et al., 2006).

A denominação “luminal” é devida à semelhança entre a expressão gênica destes tumores e o epitélio luminal normal da mama, onde há a expressão frequente das citoqueratinas CK8 e CK18 (Sotiriou et al., 2003). Tumores do tipo luminal A são positivos para ER e PR e negativos para HER2, ao passo que tumores tipo luminal B são

---

ER+ e negativos para PR e HER2 (Braun et al., 2013). Os tumores do tipo luminal, A e B, podem ainda ser discriminados pelo índice de proliferação Ki67 baixo ou alto, respectivamente (Thompson et al., 2011). Comparativamente, os tumores luminais A apresentam bom prognóstico, são resistentes à quimioterapia e sensíveis ao tratamento hormonal, ao passo que os luminais B apresentam, em geral, pior prognóstico, respondem melhor à quimioterapia e são menos sensíveis ao tratamento hormonal (Prat & Perou, 2011).

Tumores de mama do tipo *basal-like* são caracterizados pela expressão de marcadores frequentemente encontrados em células normais basais/mioepiteliais. O tumor *basal-like* é um subtipo particularmente agressivo definido molecularmente por um conjunto de genes expressos pelas células epiteliais da camada basal ou externa da glândula mamária adulta. Estes tumores são prevalentes em mulheres jovens e muitas vezes apresentam recorrência em curto prazo. A maioria dos tumores *basal-like* é negativa para os receptores ER, PR e HER2, também denominados triplo-negativos, e por isso as opções terapêuticas para as portadoras deste subtipo de tumor são limitadas. Embora os termos *basal-like* e triplo-negativos sejam frequentemente usados como sinônimos, há diferença entre eles. O termo *basal-like* é definido pela expressão gênica de tumores que são na maioria ER, PR e HER-2 negativos e positivos para as citoqueratinas 5/6 (CK5 e CK6) e para o receptor do fator de crescimento epitelial EGFR. Além disso, os tumores triplo-negativos são histologicamente heterogêneos, podendo incluir os carcinomas ductais invasivos (*basal-like* e cânceres *não-basal-like*) e outros subtipos, como medular, escamoso e apócrino. (Carey et al., 2010) As pacientes portadoras dos tumores triplo-negativos não são beneficiadas pelas terapias existentes e por isso é indicado o tratamento quimioterápico sistêmico (Rakha & Ellis, 2009; Morrow & Hortobagyi, 2009). Entre os cânceres de mama esporádicos, o fenótipo *basal-like* corresponde a 10 a 20% dos tumores

---



invasivos, ao passo que entre os tumores hereditários com mutação no gene *BRCA1*, este subtipo representa aproximadamente 90% dos casos (Joosse et al., 2011).

Os tumores cuja classificação molecular é conhecida como subtipo HER-2 são frequentemente de alto grau e apresentam alta taxa proliferativa, ausência de expressão de genes associados ao subtipo *basal-like* e baixos níveis de expressão dos genes associados com o subtipo luminal. Embora sejam conhecidos como *HER-2* positivos, cerca de 30% deles são negativos para HER-2, porém se assemelham aos positivos por apresentarem mutações neste gene ou ainda em genes da via do *ERBB2* apresentando, portanto, um fenótipo similar aos tumores dirigidos por amplificação deste gene (Prat & Perou, 2011).

Receptores de andrógeno (RA) também têm sido estudados em CM. Collins et al (2011) relataram que a expressão do receptor de andrógeno (RA) é positiva em CM luminal A e B (91% e 68%, respectivamente), HER2 (59%) e *basal-like* (32%), mesmo estes últimos sendo negativos para os receptores hormonais ER e PR. Todavia, o papel do RA no desenvolvimento e progressão dos CM ainda precisa ser mais bem estudado.

Os subtipos *basal-like* e HER-2 têm sido relacionados com a diminuição da sobrevida em pacientes tratados com cirurgia e radioterapia (Perou et al., 2000; Chin et al., 2006).

Recentemente, foi relatado um diferente subtipo de CM denominado “*Claudin-low*”, que tem como característica a expressão diminuída ou ausente de genes de adesão celular, como por exemplo, *Claudinas 3, 4 e 7* e *E-caderina* (Perou, 2010). Marcadores de superfície celular de células luminais diferenciadas, como EpCAM e MUC1 também possuem baixa ou nenhuma expressão nesse subtipo tumoral. Os tumores *Claudin-low* têm características de células-tronco mamárias (CD44+/CD24-/baixa e ALDH1A1+), aumento de expressão de marcadores característicos da transição epitélio-mesênquima (TEM) e de genes de resposta imunológica. Clinicamente, a maioria dos tumores *Claudin-low* é do

---

subtipo ductal invasivo triplo-negativo. Dados preliminares indicam que estes tumores apresentam uma taxa de resposta à terapia neoadjuvante intermediária em comparação com os tumores luminais ou *basal-like* (Prat et al., 2010).

Assim, embora o ER e o HER-2 se tornaram os protótipos de marcadores preditivos na oncologia clínica capazes de modificar a conduta terapêutica, eles são incapazes de prever a evolução da totalidade das pacientes incluindo aquelas que desenvolverão metástases e as que possuem um baixo risco de evolução da doença.

Um estudo recente utilizando diferentes abordagens moleculares que incluem análises genômica, transcriptômica e proteômica em um número grande de tumores mostrou que diversas alterações genéticas e epigenéticas convergem fenotipicamente em quatro classes principais de CM e que esse resultado não é apenas consistente com a evolução convergente dos genes, mas também com modelos de expansão clonal de CM e seleção de células *in vivo* o que explicaria a heterogeneidade fenotípica observada nos subtipos de CM conhecidos (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

## **2. HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA BASEADA EM ARRAYS**

A técnica de aCGH permite a detecção quantitativa em alta resolução das alterações no número de cópias de regiões genômicas específicas em diversos tipos de doenças, incluindo câncer assim como a associação com características clínicas. O princípio metodológico baseia-se na coibridação do DNA extraído da amostra tumoral e de referência marcados diferencialmente com distintos fluoróforos seguido da hibridação em lâmina de vidro contendo milhares de sondas (Ishkanian et al., 2010; Park et al., 2010). Usando a comparação com o genoma de referência, é possível detectar alterações

---

genômicas incluindo ganhos, perdas e/ou ampliações genômicas denominadas de CNV (*Copy Number Variation*) quando germinativas e CNA (*Copy Number Alteration*) quando somáticas ou adquiridas (Li et al., 2009). As alterações no número de cópias do DNA podem ser categorizadas em variações submicroscópicas (menores que 500Kb) e microscópicas (maiores do que 500Kb) e podem variar de 1Kb e 1Mb de tamanho (Tang & Amon, 2013).

As diferenças na sequência do DNA do genoma humano contribuem para a nossa singularidade e influenciam a maioria das nossas características, inclusive a suscetibilidade às doenças. Até recentemente, acreditava-se que os polimorfismos em nucleotídeos únicos (SNP) eram a forma mais prevalente e importante da variação genética. Contudo, as CNVs englobam pelo menos três vezes o total de SNPs, podendo abranger milhões de bases no DNA, contendo genes inteiros e suas regiões reguladoras. Embora essas CNVs em algumas regiões do genoma não tenham consequência fenotípica óbvia, em outras regiões podem influenciar a dosagem gênica. Em humanos, 85%–95% das CNVs estão associadas com mudanças na expressão dos genes afetados. Assim, essas alterações poderiam resultar, isoladamente ou em combinação com outros fatores genéticos ou ambientais, em um fenótipo alterado, sendo muito importantes tanto em doenças humanas como na resposta à terapia (Feuk et al., 2006; Tang & Amon, 2013, *The Centre for Applied Genomics* acessado em 20/04/2013 [http://www.tcag.ca/scherer/documents/CNV\\_FAQ.pdf](http://www.tcag.ca/scherer/documents/CNV_FAQ.pdf)).

Alterações recorrentes em diversas amostras tumorais podem auxiliar na caracterização molecular do tumor, identificando potenciais processos celulares e genes alterados, alvos terapêuticos e marcadores moleculares úteis ao diagnóstico (Albertson et al., 2003; Stratton et al., 2009; Santarius et al., 2010).

---

## 2.1 Alteração no número de cópias genômicas identificadas por aCGH em carcinomas mamários

A técnica de aCGH tem contribuído para a caracterização da relação entre possíveis estágios precursores de câncer mamário e carcinoma invasivo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes supressores de tumor e oncogenes.

A busca na base de dados *PubMed* por “breast cancer AND array CGH”, resulta em 188 artigos publicados (22 de novembro de 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=breast+cancer+AND+array+CGH>). Ao passo que se pesquisarmos por “copy number alterations AND breast cancer”, temos como resultado 326 artigos publicados até a mesma data (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=copy+number+alterations+AND+breast+cancer>). A tabela 1 apresenta um resumo dos principais relatos utilizando aCGH em carcinomas de mama, o número de amostras estudadas, a plataforma usada, os principais resultados e os métodos de validação empregados em cada estudo.

Stephens et al. (2012) usando análise das variações do número de cópias genômicas aliada a sequenciamento de éxons e de microRNAs, em 100 tumores, encontraram correlações importantes entre o número de mutações, idade ao diagnóstico e o grau histológico. Os autores relataram várias assinaturas de mutação, onde verificaram mutações *drivers* em vários novos genes relacionados ao câncer, incluindo *TBX3*, cuja função está relacionada ao desenvolvimento da glândula mamária. Entre todos os tumores, foram encontradas mutações *drivers* em pelo menos 40 genes e 73 combinações diferentes de genes mutados.

---

**Tabela 1.** Resumo dos principais estudos que identificaram alterações genômicas em carcinomas de mama.

Referência	Amostras	Plataforma	Resultados Principais	Técnica de Validação
<b>Pollack et al (2002)</b>	44 CM ductais e 10 linhagens celulares	Human cDNA microarray contendo 6691 genes diferentes	Perdas em: 1p, 3p, 8p, 13q Ganhos em: 1q, 8q, 17q, 20q	RT-Qpcr
<b>Callagy et al (2005)</b>	52 CM primários linfonodos negativos	AmpliOnc I (Vysis) Microarray	Ganhos em: 11q13, 17q12, 20q13	FISH
<b>Bergamaschi et al. (2006)</b>	89 CM primários	cDNA microarray (Stanford Functional Genomics Facility) com 39632 cDNAs representando 22.488 genes	CNAs associadas com grau tumoral: perda em 3p14, 4q31-q35, e5q13-q23 em ca de alto grau. CNAs associadas com status ER-: Perda em 5q11-q35 e 12q14-23, e ganhos em 6p21-p25 and 7p12. Loci associados com mutação em TP53 ganhos em 1q21-q32 TP53 selvagem e perda em 5q14-q23 com TP53 mutante.	-
<b>Chin et al (2006)</b>	145 CM primários	BAC array CGH	Ganhos em: 8p11, 11q13, 17q12, 20q13	IHC
<b>Han et al (2006)</b>	28 CM ER+	1.440 BACs	Ganhos em 1q32.1, 17q23.3, 8q24.11, 17q12-q21.1,e 8p11.21; perdas em 6q14.1-q16.3, 11q21-q24.3,e 13q13.2-q14.3.  Grupo com recorrência: perda 11p15.5-p15.4, 1p36.33, 11q13.1, 11p11.2. No subgrupo com envolvimento linfonodos: perda 11p15 e 1p36	qPCR
<b>Hwang et al (2008)</b>	62 CM primários/31 pacientes evoluíram metastase	4.044 BACs	Ganhos em 5p15.33, 11q13.3, 15q26.3, 17q25.3, 18q23 e 21q22.3; Perdas em 9p12, 11q24.1 e 14q32.33.	Validação qPCR dos genes <i>TERT</i> e <i>CRR9</i> para ganhos: <i>HSPA8</i> e perda <i>ROBO4</i>

<b>Hawthorn et al (2010)</b>	24 CM ductais infiltrantes	Affymetrix 250K	Ganhos: 1q21.3, 6p21.3, 7p11.2-p12.1, 8q21.11 e 8q24.3 Novo amplicon: 5p15.33 Perdas: 1p36.22, 8q23.3, 11p13, 11q23 e 22q13	24 casos – LOH em Xp24 e Xp25
<b>Han et al. 2011</b>	63 CM ductais infiltrantes	4,045 BACs	Ganho em 8q11.22-q24.23 e 17q21.32-q21.33 e perda de 17p12 foram associados com maior resistência à adriamicina. Ganho de cópia em 10q26.3 associado com sensibilidade à quimioterapia.	FISH
<b>Bonnet et al. (2012)</b>	135 CM ductais invasivos	5878 BACs	Ganhos ou perdas particularmente nos cromossomos 1, 7, 8, 11, 16, 17 e 20, agrupados em seis grupos principais.	<i>Genomic instability index (G2I)</i>
<b>Chao et al. (2012)</b>	94 CM primários	Agilent 244k	Várias micro-alterações de acordo com o subtipo molecular, em especial alterações nos genes <i>PTEN</i> e <i>RB1</i>	mRNA-seq
<b>The Cancer Genome Atlas Network (2012)</b>	773 CM primários	Affymetrix 6.0 SNP array	Amplificação de regiões que contêm <i>PIK3CA</i> , <i>EGFR</i> , <i>FOXA1</i> e <i>HER2</i> , bem como deleções de regiões contendo <i>MLL3</i> , <i>PTEN</i> , <i>RB1</i> e <i>MAP2K4</i> . Além de perda em 5q e ganho de 10p em cânceres <i>basal-like</i> e ganho em 1q e/ou perda em 16q em tumores luminiais.	análise integrada utilizando várias técnicas diferentes como: metilação do DNA, sequenciamento do exoma, mRNA arrays, sequenciamento de microRNA e array de proteína de fase reversa
<b>Curtis et al. (2012)</b>	2477 CM primários	Affymetrix 6.0 SNP array	As principais regiões alteradas incluem genes drivers conhecidos como <i>ZNF703</i> , <i>PTEN</i> , <i>MYC</i> , <i>CCND1</i> , <i>MDM2</i> , <i>ERBB2</i> , <i>CCNE1</i> e alguns putativos como <i>MDM1</i> , <i>MDM4</i> , <i>CDK3</i> , <i>CDK4</i> , <i>CAMK1D</i> , <i>PI4KB</i> e <i>NCOR1</i> .	LR-PCR

BAC: cromossomo artificial de bactéria; CM: carcinomas de mama; RT-qPCR; RT-PCR quantitativa em tempo real; qPCR: PCR quantitativa em tempo real; FISH: hibridação *in situ* por fluorescência; LOH: perda de heterozigose; SNP: nucleotídeo de polimorfismo único; mRNAseq: sequenciamento de alto desempenho de RNAs mensageiros; LR-PCR: LongRange PCR

Hawthorn et al. (2010) realizaram a análise de CNAs em 22 carcinomas ductais infiltrantes e identificaram ampliações em 1q21.3, 6p21.3, 7p11.2-p12.1, 8q21.11 e 8q24.3. Um novo amplicon foi identificado em 5p15.33. Perdas frequentes foram relatadas em 1p36.22, 8q23.3, 11p13, 11q23, e 22q13. Análise de perda de heterozigose (LOH) para marcadores espalhados ao longo do cromossomo 17 revelou três tumores com perda do cromossomo inteiro ou de 17p.

Kwei et al. (2010) relataram três padrões distintos de CNAs entre os tumores de mama. O primeiro tipo apresentava poucas CNAs, que tendiam a serem ganhos ou perdas de braços inteiros de cromossomos, mais especificamente ganhos de 1q e 16p com perda de 16q. Esse padrão foi denominado de “simples”, estando associado principalmente com tumores ER+, moderados a altamente diferenciados, com padrões de expressão do tipo luminal A. Um segundo padrão de alteração genômica mostrava alto nível de ampliações, agrupados em um ou mais braços de cromossomos. Esse padrão foi chamado de “amplificador” e era característico dos subtipos luminal B e *ERBB2*. Estas ampliações estavam mapeadas em 8p12 (*FGFR1*), 8q24 (*MYC*), 11q13 (*CCND1*), 12q15 (*MDM2*), 17q12 (*ERBB2*) e 20q13 (*ZNF217*), bem como outros loci ainda não caracterizados. O terceiro tipo de alteração genômica foi caracterizado por um padrão complexo de ganhos e perdas, abrangendo regiões pequenas e resultando em um perfil segmentado. Esse padrão, denominado de “complexo”, foi mais comum em tumores triplo-negativos, tumores *basal-like* e associado à mutação em *TP53*. Foram detectadas alterações frequentes como ganhos em 10p e perdas em 3p, 4p, 4q, 5q, 14q, 15q e, em alguns casos em 17q (Kwei et al., 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que tumores ER+PR+ tem um perfil genômico diferente quando comparado com tumores ER+PR- (Arpino et al., 2005; Carracedo et al, 2012). Utilizando aCGH em 48 CM (25 ER+PR+ e 23 ER+PR-), Carracedo et al (2012)

---

encontraram regiões significativas de perda em 1p, 6q, 8p, 9p, 16q, 17p, 11q e 22q, incluindo genes supressores tumorais, envolvidos em apoptose, mitose e angiogênese. Regiões de ganho em 1q, 8q, 8p, 11q, 16p, 17q e 20q também foram encontradas, incluindo genes relacionados no controle do ciclo celular, angiogênese, metástase e resistência à apoptose induzida por agentes quimioterápicos. Essas regiões alteradas entre os dois grupos, poderia explicar, pelo menos em parte, algumas características normalmente relacionadas com tumores ER+PR-, como por exemplo uma maior instabilidade genética, fenótipo agressivo, resposta limitada à terapia endócrina e a perda de expressão de PR.

O perfil genômico também foi avaliado no contexto de identificar regiões alteradas associadas à metástase ou recorrência no CM. Chin et al. (2007) avaliaram 171 carcinomas mamários ER- e relataram que ampliações em 8q22.3 (*EDD1*, *WDSOF1*), 8q24.11-13 (*THRAP6*, *DCCI*, *SQLE*, *SPG8*) e 11q14.1(*NDUFC2*, *ALG8*, *USP35*) estavam associadas com menor sobrevida livre de doença (metástases à distância) e sobrevida global. Gravier et al. (2010), pesquisaram 168 carcinomas ductais pequenos sem comprometimento linfonodal (T1T2N0) divididos em dois grupos de acordo com o prognóstico. Utilizando aCGH, os autores selecionaram três regiões genômicas específicas (ganho em 2p22.2, perda em 3p23 e ganho em 8q21-24) que poderiam fornecer importantes informações de prognóstico podendo auxiliar na predição do risco de progressão metastática nesse tipo tumoral.

Ao avaliar as alterações genômicas dos CM primários e metástases cerebrais, Wikman et al. (2012), relataram que as alterações detectadas nas metástases, muitas vezes, eram mais complexas. Segundo os autores, os genes *PTEN* e *EGFR* parecem desempenhar um papel importante na formação de metástases cerebrais. Este estudo contribuiu para

---



identificar um subgrupo de pacientes de CM com risco aumentado de desenvolver metástase cerebral.

A ausência de biomarcadores preditivos em CM é uma questão clinicamente importante. Em um estudo recente, Han et al. (2011) relataram uma associação significativa da deleção em 17p12, detectada por aCGH, com resistência à quimioterapia neoadjuvante em CM.

Muitos dos estudos moleculares do CM têm focado em uma ou mais plataformas de alto desempenho para análise genômica, transcriptômica, epigenômica, proteômica e metabolômica. Apesar da imensa contribuição que estes estudos separadamente têm trazido para o conhecimento da doença, muitos biomarcadores por eles identificados não são confirmados em outros estudos ou populações. Assim, estratégias que combinem as informações geradas por diferentes plataformas experimentais e de dados depositados em bancos públicos permitem uma visão mais global da doença. Estas plataformas de análise permitem a integração de dados de expressão gênica e proteica, interações proteína-proteína e vias alteradas, alterações cromossômicas, mutações e alterações epigenéticas e sua associação com a história clínica, resposta à drogas, etc. A abordagem de análise integrada tem como objetivo principal a medicina personalizada, para identificação de um pequeno grupo de genes/proteínas/microRNA, etc., que possam ser usados para melhorar o diagnóstico, prever o desfecho clínico e a resposta ao tratamento (Fortney & Jurisica, 2011).

Curtis et al. (2012), analisaram o número de cópias genômicas integradas à expressão gênica de mais de 990 CM primários, onde as principais regiões alteradas incluem genes *drivers* incluindo *ZNF703*, *PTEN*, *MYC*, *CCND1*, *MDM2*, *ERBB2*, *CCNE1* e alguns putativos como *MDM1*, *MDM4*, *CDK3*, *CDK4*, *CAMK1D*, *PI4KB* e *NCOR1*. Embora tenham sido observados perfis distintos no número de cópias caracterizando os

---

subgrupos, um agrupamento não supervisionado dos dados revelou heterogeneidade dentro dos subgrupos. Analisando os tumores Luminais os autores observaram um alto número de casos com amplificação de *ERBB2*, sugerindo a necessidade de refinamento do subtipo HER2 enriquecido. Analisando minuciosamente os limites de CNAs, relacionaram a localização e a frequência com que os genes podem ser interrompidos por eventos de amplicons. Como resultado das CNAs que ocorrem dentro dos genes, os autores verificaram que ocorriam quebras em alguns desses genes, de tal forma que um segmento de ganho ou perda do número de cópias era acompanhado por um número de cópias neutro, interrompendo sua sequência contígua. Alguns genes recorrentemente envolvidos em quebras incluíam *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *IGF1R*, *PPP1R12B* e *PTPRT*. Outros genes, como *CCND1*, *ZNF703* não se apresentaram com quebras e refletiam amplicons que normalmente se estendem por muitos genes (Curtis et al., 2012)

Um estudo elegante publicado recentemente integrando análises genômica, transcriptômica e proteômica (baseados em *microarrays* de expressão e de metilação, *SNPs arrays*, sequenciamento de miRNAs e de exoma total e *array* de proteínas em fase reversa) em um grupo grande de tumores de mama demonstrou que diversas alterações genéticas e epigenéticas convergem fenotipicamente nas quatro classes principais de CM, com alterações genéticas particulares. As análises demonstraram maior heterogeneidade dentre os tumores luminais ER+ em termos de expressão gênica, perfil de mutações, alterações no número de cópias genômicas e evolução clínica. Dentre as características mais proeminentes, foram relatados altos níveis de expressão gênica e proteica da assinatura luminal, que inclui os genes *ESR1*, *GATA3*, *XBPI* e *MYB*, além do maior número de genes mutados. A via do *TP53* apresentou-se diferencialmente inativada nestes tumores, com menor frequência de mutação no subtipo luminal A e maior frequência no luminal B. Além do *TP53*, outros eventos inativadores da via do *TP53* foram identificados predominantemente no subtipo luminal B, como perda do gene *ATM* e amplificação do

---

---

gene *MDM2*. Estes dados sugerem que a via do *TP53* está predominantemente inalterada nos tumores do subtipo luminal A, porém inativada nos tumores luminal B de características mais agressivas. A análise integrada do perfil de expressão gênica e proteica no subtipo *HER2-enriched* revelou dois subgrupos distintos *HER2+*, confirmando que nem todos os tumores clinicamente *HER2+* pertencem ao subtipo *HER2-enriched* e vice-versa. Os tumores *HER2-enriched* mostraram alta frequência de aneuploidias, maiores taxas de mutações somáticas raras e amplificação de vários genes como *FGFR*, *EGFR*, *CDK4* e *CCND1*. Nos tumores *HER2+* foram identificadas mutações somáticas em genes com potencial terapêutico, como *PIK3CA*, *HER2*, *EGFR*, e *HER3* e, em menor frequência, a mutação em *PTEN* e *PIK3R1* e perdas genômicas de *PTEN* e *INPP4B*. Estas assinaturas diferenciais podem ser utilizadas para a predição de terapias alvo-dirigidas anti-*HER2*. As alterações mais notórias nos tumores do subtipo *basal-like* incluíram mutação nos genes *ATM* e *TP53*, inativação de *BRCA1* e *BRCA2*, perda de *RBI* e amplificação do gene da *CCND1* e *MYC*, alterações estas previamente identificadas em tumores de ovário. Estas alterações podem ser consideradas “*drivers*” associadas à carcinogênese dos dois tipos tumorais e indicam que abordagens terapêuticas comuns podem ser consideradas para o tratamento destes tumores. Mutações no gene *TP53* nos tumores *basal-like* eram, em sua maioria, do tipo *nonsense* e *frameshift*; mutações *missense* predominaram nos tumores luminal A e B. Além disso, genes novos com alterações significativas foram identificados, incluindo *RUNX1*, *CBFB*, *AFF2*, *PIK3R1*, *PTPN22*, *PTPRD*, *NF1*, *SF3B1*, *CCND3* e *TBX3*. O gene *TBX3* abrigava 13 mutações, as quais sugerem a perda da sua função. Em resumo, os resultados deste estudo sugeriram que cada um dos subtipos tumorais parece ser gerado a partir de alterações genéticas e epigenéticas distintas, corroborando as hipóteses de expansão clonal e seleção de células *in vivo* que tentam explicar a heterogeneidade dos tumores mamários (Tabela 1, The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

---



### **3 OBJETIVO GERAL**

Identificar alterações no número de cópias do DNA (ganhos e perdas) em carcinomas mamários e associar os achados com características clínicas e histopatológicas para selecionar candidatos a biomarcadores prognósticos.

#### **Objetivos Específicos**

- Identificar o perfil de alterações genômicas em carcinomas de mama;
  - Comparar os achados com as características clínicas, histopatológicas e dados da literatura para identificar potenciais biomarcadores prognósticos.
-



*Material e  
Métodos*

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Pacientes e amostras**

Foram avaliadas 53 amostras de carcinomas de mama de pacientes que se submeteram a ressecção segmental ou mastectomia, provenientes do Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP.

As pacientes foram seguidas prospectivamente, sendo que nenhuma delas tinha histórico prévio de câncer. As pacientes tratadas cirurgicamente, incluindo dissecação dos linfonodos axilares, foram submetidas à radioterapia e terapia sistêmica adjuvante, se indicado. Apenas uma paciente recebeu quimioterapia antes da cirurgia, e neste caso, o material da biópsia foi utilizado para a análise. O seguimento clínico das pacientes foi de 88 meses (mediana, e intervalo de 1-167 meses.).

Imediatamente após a cirurgia, as amostras de tumor foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos congelados foram histopatologicamente avaliados. A classificação histológica foi realizada de acordo com o WHO International Classification of Disease for Oncology (1990), e o estadió clínico foi determinado de acordo com o AJCC TNM Staging System for Breast Cancer (2010). A malignidade dos carcinomas infiltrativos foi pontuada de acordo com Scarff-Bloom and Richardson Grading System (1957). As características clínicas e histopatológicas das pacientes estão descritas na Tabela 2.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina, UNESP-Botucatu (CEP 4391-2012). Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

---

**Tabela 2.** Características clínicas e histopatológicas das pacientes com carcinoma de mama incluídas na análise de aCGH.

<b>Características</b>	<b>N = 53</b>	<b>(%)</b>
<b>Idade (anos)</b>		
Mediana (intervalo)	59 (30-94)	
≤50	18	34
>50	35	66
<b>Grau Histológico</b>		
I	6	11
II	22	42
III	24	45
Nd	1	2
<b>Status dos receptores (IHC)</b>		
<b>ER</b>		
Negativo	17	32
Positivo	35	66
Nd	1	2
<b>PR</b>		
Negativo	28	53
Positivo	24	45
Nd	1	2
<b>HER-2</b>		
Negativo (0-1)	42	79
Positivo (3+)	10	19
nd ou indefinido (2+)	1	2
<b>Índice proliferativo (status de Ki67)</b>		
Baixo (≤25%)	23	43
Alto (>25%)	18	34
Não reativo	10	19
Nd	2	4
<b>Tamanho tumor primário (pT)</b>		
pT <sub>1</sub>	10	19
pT <sub>2</sub>	32	60
pT <sub>3</sub>	3	6
pT <sub>4</sub>	7	13
Nd	1	2
<b>Status de linfonodo regional</b>		
pN <sub>0</sub>	19	36
pN <sub>1</sub>	18	34
pN <sub>2</sub>	8	15
pN <sub>3</sub>	7	13
Nd	1	2
<b>Quimioterapia adjuvante</b>		
Não	19	36
Sim	33	62
Nd	1	2
<b>Radioterapia adjuvante</b>		
Não	13	24
Sim	39	74



---

Nd	1	2
<b><i>Hormonioterapia adjuvante</i></b>		
Não	17	32
Sim	36	68
Nd	0	0

---

## 4.2 Extração de DNA

Nas amostras de tecido a fresco congelado de carcinomas mamários foram feitos cortes de congelamento sequenciais de 5  $\mu$ m, com a utilização de um criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha). Posteriormente, as lâminas preparadas foram coradas com hematoxilina e eosina, as quais foram analisadas pela patologista Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, a fim de delimitar a região tumoral para realização de macrodissecção. As amostras macrodissecadas foram homogeneizadas utilizando o equipamento Precellys® (BioAmerica Inc, Florida, EUA). A extração do DNA foi realizada utilizando o método baseado na digestão com proteinase K (Qiagen), extração das proteínas e dos ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) e precipitação com etanol 100%.

Após a extração do DNA, as amostras foram tratadas com RNase A de acordo com protocolo do *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies) com o objetivo de eliminar RNA contaminante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e a qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,8%.

### 4.3 CGH-Array (*Array-Based Comparative Genomic Hybridization*)

#### 4.3.1 Marcação das Amostras

As alterações no número de cópias de DNA foram geradas utilizando-se a plataforma *Human Genome CGH Microarray 4x180K* (Agilent, Santa Clara, CA, USA), a qual contém aproximadamente 180.000 sondas que mapeiam genes bem caracterizados, particularmente envolvidos em câncer, assim como, sequências codificadoras e não codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>).

O DNA genômico comercial feminino (Promega, Mannheim, Germany), o qual é constituído por DNA proveniente de múltiplos doadores, foi utilizado como referência nos experimentos. Foram utilizados 500ng de DNA e a marcação das amostras baseou-se no padrão de qualidade apresentado em gel de agarose 0,8%. O DNA obtido foi submetido à marcação pelo Kit *Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit* (Agilent Technologies), de acordo com especificações do fabricante. Inicialmente foi realizada uma diluição para um volume final de 22,2 µL e as amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,6µL de *10x Buffer C*, 0,2µL BSA Acetilado e 0,5µL das enzimas *AluI* e *RsaI* (Prodimol), totalizando 26µL de volume da reação. As reações contendo amostras tumorais foram incubadas a 37°C por um período que variou de 1 a 2 horas (dependendo da integridade da banda de DNA em gel de agarose) e a 65°C por 20 min. A reação contendo o DNA de referência foi incubada a 37°C por 2 horas e a 65°C por 20 min. em todos os procedimentos. Em seguida, foram adicionados 5µL de *Random Primer* e as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 min. e transferidas para o gelo. A marcação foi realizada com a adição de 10µL de *5x Buffer*, 5µL do dNTP mix, 1µL da enzima *Exo-Klenow* e 3µL de Cy3 dCTP para amostras tumorais e Cy5 dCTP para a

referência (Amersham). As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas, 65°C por 10 min. e mantidas em gelo. A purificação foi realizada em mini-colunas de celulose (Microcon YM-30, Millipore) de acordo com instruções do fabricante e eluídas em 50µL de TE (tampão Tris-EDTA); 1x pH 8,0 (Prodímol).

#### 4.3.2 Hibridação e Lavagem

A intensidade de marcação e o rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), sendo combinadas as amostras tumoral e referência com eficiências de marcação semelhantes. Adicionou-se a cada reação *Human Cot* DNA humano (Invitrogen), 10X *aCGH Blocking Agent* (Agilent) e 2X *Hi-RPM Hybridization Solution* (Agilent). A mistura de hibridação foi desnaturada a 95°C por 3 min. e incubada a 37°C por 30 min. em banho seco. Foram adicionados 100µL da mistura final às lâminas. A lavagem das mesmas ocorreu em banhos consecutivos nas soluções de *Wash Buffer 1* por 5 min., *Wash Buffer 2* por 1min, Acetonitrila por 10seg e *Stabilization and drying solution* por 30 seg.

#### 4.3.3 Extração e Análise dos Dados de *CGH-array*

A captura das imagens foi obtida após o uso do *DNA microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology* (Agilent Technologies) e o *Scan Control Software 8.1*. Foi utilizado o *Feature Extraction v10.7* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a extração dos valores de intensidade a partir das imagens geradas pelo sistema. O programa também possibilita a aplicação de testes de qualidade das hibridações (relatórios *QC Reports*). Este procedimento também faz as correções necessárias dos valores de intensidade provenientes de cada corante (usando o algoritmo *Lowess*), para

---

eliminar as diferenças de eficiência da emissão dos corantes fluorescentes Cy3 e Cy5 e a subtração do *background* local (valor de intensidade ao redor de cada *spot*).

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Nexus version 7.0* (Biodiscovery, CA, USA) e a seleção dos casos ocorreu de acordo com o preenchimento dos critérios de qualidade determinados pelo *software* (valores até 0,3). Foi utilizado o algoritmo *FASST2 Segmentation, threshold* de significância de 1,00E-6 e máximo espaçamento entre sondas adjacentes antes de realizar a quebra de um segmento de 1Mb. Foram consideradas cinco sondas consecutivas alteradas para determinação de um segmento como alterado quanto ao número de cópias. Os limiares considerados foram: 0,4 para ganhos de uma cópia, 0,8 para ganhos de duas ou mais cópias (alto nível de ganhos), -0,4 para perdas de uma cópia e -1,25 para perdas de duas cópias (deleção homozigota). As amostras foram agrupadas com a utilização do algoritmo *Complete Linkage Hierarchical* e exclusão de cromossomos sexuais.

A seleção de regiões para análises mais detalhadas baseou-se na inclusão de alterações presentes em mais de 20% dos casos. As comparações entre os diferentes grupos baseados em dados clínico-patológicos e alterações moleculares foram realizadas no programa *Nexus version 7.0* (Biodiscovery, CA, USA) com a utilização do teste exato de *Fisher* e  $P < 0,05$  para a determinação de significância. Curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevida livre de doença (SLD) foram construídas utilizando o tempo entre a data da cirurgia e a data de diagnóstico de metástase à distância ou a data da última informação de cada paciente. Para as curvas de sobrevida global foi considerada a data da cirurgia até a data de óbito específico pelo carcinoma de mama ou a última informação de cada paciente. Foram utilizados os programas GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) e SPSS version 17.0 (SPSS;Chicago, IL) para Windows.

---



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM CARCINOMAS DE MAMA

A análise de alterações no número de cópias genômicas foi realizada em 53 amostras a fresco de carcinomas ductais invasivos (CDI) utilizando a metodologia de CGH-*array* em lâminas de 4x180K (Agilent Technologies).

#### 5.1.1 Alterações genômicas recorrentes em Carcinomas Ductais Invasivos (CDI)

A análise global das alterações observadas na análise de CGH-*array* para os 53 casos de CDI revelou 3.849 alterações genômicas (média de 72,6), sendo 1.731 ganhos (45%), 1.622 perdas (42%), 444 ganhos em alto nível (12%) e 52 perdas homozigotas (1%). O perfil de alterações genômicas para cada caso, assim como, o ideograma representativo da análise global das alterações em cada cromossomo estão compilados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A análise dos resultados quanto ao tamanho das alterações revelou ganhos genômicos envolvendo regiões de 579 a 1.471 Kb (média de 1.025 Kb), enquanto as perdas variaram de 52 a 95.948 Kb (média de 2.264 Kb).

Foram identificadas regiões envolvidas em alto nível de ganhos em 83% (44/53) das amostras, com uma média de 10,1 alterações por caso. Estas alterações estavam presentes em no mínimo uma região em 15 casos (casos 302, 527, 540, 542, 562, 574, 596, 830, 832, 836, 848, 986, 992, 996 e 1011) e no máximo em 51 regiões em um caso (caso 993).

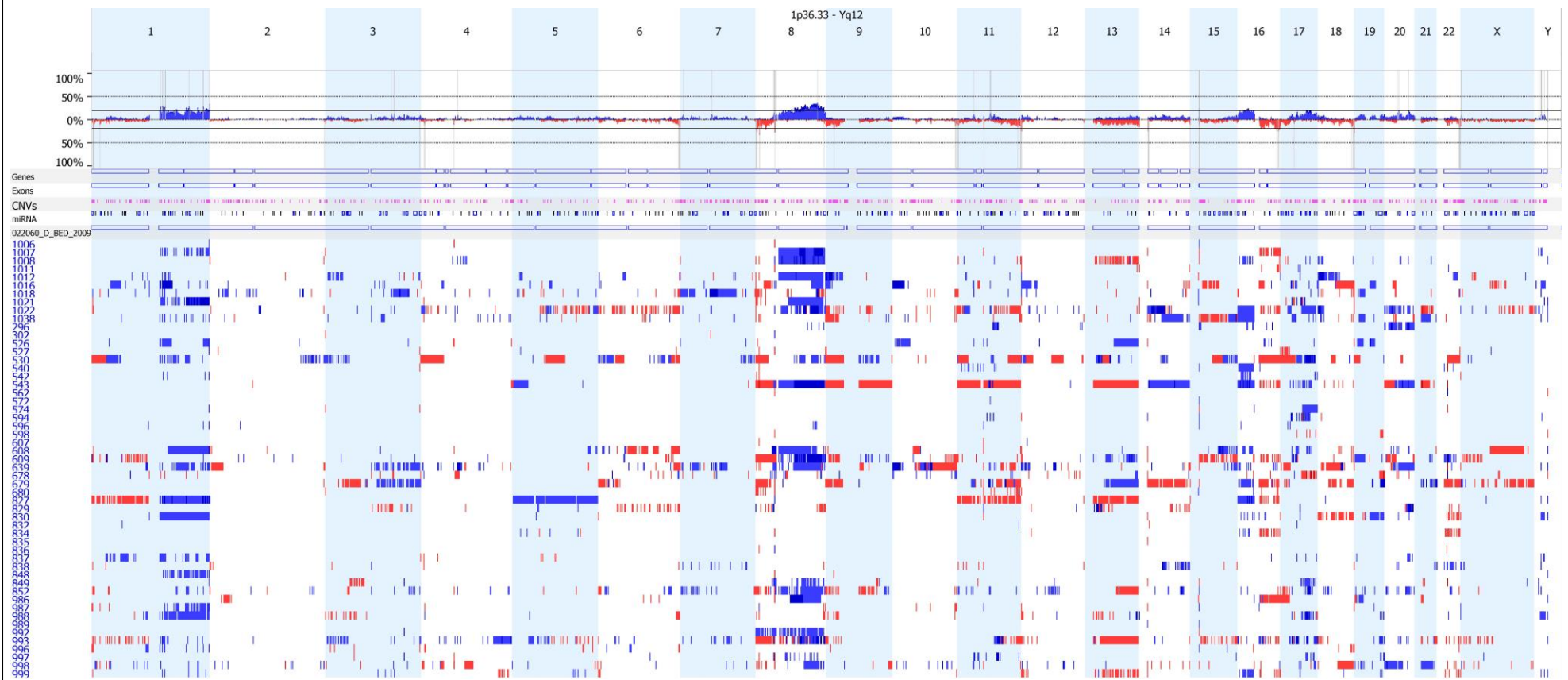
Doze dos 15 casos com alto nível de amplificação em pelo menos uma região genômica apresentavam comprometimento de linfonodos (LN+), porém apenas dois deles

---

apresentaram metástase à distância durante o seguimento clínico (casos 562 e 830). As regiões amplificadas estavam distribuídas por todos os cromossomos, sendo que o cromossomo 5 apresentou o menor número de alterações (quatro alterações) e o cromossomo 8 o maior número (74 alterações).

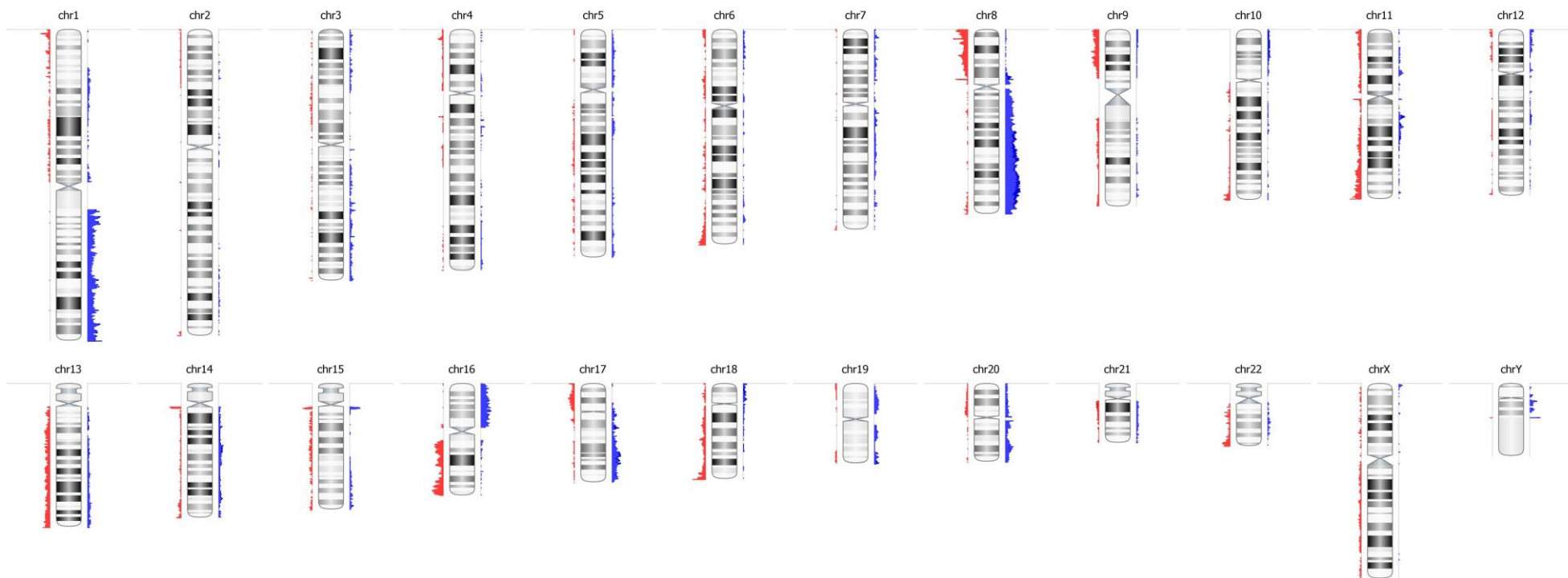
Deleções homozigotas foram observadas em 52% (28/53) das amostras de CDI. Foi verificada uma média de 1,9 perdas homozigotas por caso, com máximo de sete alterações detectadas no caso 678, que apresentou comprometimento de linfonodos, estadio 3, grau 3 e desenvolveu metástase pleural 38 meses após a cirurgia. Estas alterações abrangeram os cromossomos 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 17, 19, 21 e 22, dos quais os cromossomos 8 e 11 apresentaram maior número de regiões envolvidas em perdas homozigotas (17 e 11, respectivamente).

---



**Figura 1** - Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 53 casos de CDI avaliados pela técnica de CGH-array. A representação das frequências de alterações em todo o conjunto cromossômico (chr1-chr22) também está apresentada no ideograma. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas. (\*) indica as alterações significativas presentes em mais de 30% dos casos. Adaptação das imagens geradas pelo programa *Nexus version 7.0*.





**Figura 2** - Ideograma ilustrando a distribuição das alterações genômicas detectadas nos 53 CDI avaliados pela técnica de CGH-*array* em todo o conjunto cromossômico (chr1- chr22). As barras à direita do eixo central de cada cromossomo representam ganhos (azuis), enquanto as barras à esquerda indicam perdas genômicas (vermelhas). Imagens geradas pelo programa *Nexus version 7.0*.

As alterações genômicas significativamente recorrentes nas amostras de CDI foram selecionadas utilizando o algoritmo *STAC* que permite a identificação das alterações no número de cópias mais frequentes no grupo amostral. Foram identificadas 19 regiões significativas presentes em mais de 20% dos CDI (Tabela 3).

Utilizando este critério, foram identificadas ganhos em 8q24.21 (36%;  $P = 0,011$ ) e 1q44 (32%;  $P = 0,0001$ ), assim como a perda em 8p11.23 (28,3%;  $P = 0,0001$ ) presentes em 28% dos casos. As demais alterações significativas foram observadas entre 21 a 28% dos casos e variaram de 44 a 1.161 Kb englobando 243 genes. Apenas um microRNA, miR-135b, foi detectado numa região de ganhos em 1q32.1 em 28,3% dos casos.

A porcentagem de cobertura de CNVs já descritas nas regiões alteradas variou de 1 a 100% e todas as CNVs encontradas foram classificadas como comuns (banco de dados DGV, do inglês *Database of Genomic Variants*). No entanto, a maioria das regiões alteradas significativamente recorrentes era maior que 100 Kb e, portanto, estas regiões podem ter significado patológico. As regiões alteradas também abrangeram pequenas regiões cromossômicas ( $< 0,1$  Mb) em 1q44, 8p23.3 e 11q25 e amplas regiões cromossômicas ( $> 1$  Mb) em 14q11.1-q11.2, 15q11.2 e 16q24.1.

---

**Tabela 3.** Regiões genômicas alteradas recorrentes entre os 53 casos de carcinoma ductal invasivo ( $P < 0,05$ ).

Região	Início (pb)	Término (pb)	Tamanho (Mb)	Evento	Genes <sup>¶</sup>	Frequência (%)	P-Valor	CNV (%)	Casos
<b>Cromossomo 1</b>									
p36.32	3.053.497	3.376.994	256447	Perda	<i>PRDM16, KIAA1675, ARHGEF16</i>	21	0.001	81.42	1021, 530, 608, 609, 827, 838, 852, 987, 993, 996 e 999
q21.1	144.132.252	144.258.430	126178	Ganhos	12	28,3	0.014	100.00	1007, 1016, 1018, 1021, 1038, 526, 530, 639, 827, 830, 837, 988, 993, 996 e 998
q21.2	148.139.735	148.980.731	840996	Ganhos	32	28,3	0.014	15.97	1007, 1012, 1016, 1018, 1021, 1038, 526, 530, 639, 827, 830, 837, 988, 993 e 996
q22	153.560.344	154.361.764	801420	Ganhos	36	28,3	0.014	4.03	1007, 1012, 1016, 1018, 1021, 526, 530, 827, 830, 837, 987, 988, 993 e 996
q32.1	203.665.962	203.783.007	117045	Ganhos	<i>MIR135B, AK095633, CDK18, PCTK3</i>	28,3	0.014	1.38	1007, 1016, 1021, 530, 608, 639, 827, 830, 837, 848, 852, 987, 988, 998 e 999
q42.3	233.187.499	233.736.881	549382	Ganhos	<i>ARID4B, ARID4B variant protein, B3GALNT2, GGPS1, MIR4753, RBM34, SNORA14B, TBCE, TOMM20</i>	28,3	0.014	61.30	1007, 1021, 1038, 526, 530, 608, 639, 827, 830, 848, 987, 988, 993 e 996
q44	246.781.814	246.878.615	96801	Ganhos	<i>OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>	32,1	0.001	100.00	1006, 1007, 1021, 526, 527, 542, 574, 596, 608, 827, 830, 837, 848, 849, 987, 988 e 996
<b>Cromossomo 8</b>									
p23.3	0	512.588	512588	Perda	<i>BC037297, BC071667, C8orf42, CR600473, DQ584928, FBXO25, OR4F21, RPL23AP53, RPL23A_20_869,</i>	24,5	0.016	99.50	1008, 1016, 1018, 1021, 1022, 1038, 530, 543, 609, 679, 680, 852 e 993

<i>ZNF596</i>										
p23.3	718.482	1.429.559	711077	Perda	<i>ERICHI-ASI, BC022082, BC038783, LOC286083</i>	24,5	0.016	34.81	1008, 1016, 1018, 1021, 1022, 1038, 530, 542, 543, 609, 680 e 993	
p23.3	1.458.281	1.502.573	44292	Perda	<i>DLGAP2</i>	24,5	0.016	100.00	1008, 1016, 1018, 1021, 1022, 1038, 530, 543, 609, 679, 680, 852 e 993	
p23.1	7.041.803	7.980.956	939153	Perda	31	24,5	0.016	100.00	1012, 1018, 527, 530, 540, 542, 543, 609, 639, 679, 836, 988 e 993	
p11.23	39.349.089	39.487.965	138876	Perda	<i>ADAM5, ADAM5P, tMDC, ADAM3A</i>	28,3	0.001	100.00	1006, 1011, 527, 562, 679, 680, 834, 848, 852, 986, 992, 993, 997 e 998	
q24.21	128.560.508	128.747.184	186676	Ganhos	<i>CASC8</i>	36	0.004	100.00	1007, 1008, 1012, 1016, 1018, 1021, 1022, 530, 543, 596, 608, 609, 639, 852, 986, 992, 993, 997 e 998	
<b>Cromossomo 11</b>										
q25	132.656.278	132.745.823	89545	Perda	<i>OPCML</i>	21	0.001	100.00	1008, 1022, 1038, 530, 543, 608, 679, 680, 827, 993 e 998	
<b>Cromossomo 14</b>										
q11.1 - q11.2	18.446.762	19.451.191	1004429	Perda	27	21	0.001	100.00	1016, 1038, 526, 608, 609, 678, 679, 830, 835, 849 e 998	
<b>Cromossomo 15</b>										
q11.2	18.717.320	19.878.723	1161403	Ganhos	30	21	0.001	100.00	1006, 1018, 1021, 540, 572, 594, 680, 987 e 996	
<b>Cromossomo 16</b>										
q23.3	81.455.868	82.099.266	643398	Perda	<i>CDH13</i>	24,5	0.011	11.07	1007, 1011, 1022, 530, 543, 609, 679, 680, 827, 834, 986, 993 e 999	
q24.1	84.416.846	85.529.759	1112913	Perda	13	24,5	0.011	37.24	1007, 1011, 1022, 530, 543, 609, 679, 680, 827, 834, 986, 993 e 999	
<b>Cromossomo 18</b>										
q23	75.811.707	76.117.153	305446	Perda	13	21	0.001	11.41	1016, 1018, 1038, 543, 608, 609, 639, 679, 830, 996 e 998	

Legenda: # estão descritos até seis genes; \*CNV- análise de CNV baseada no *Database Genomic Variants* (DGV). ☿ Foram nominados os genes quando em número igual ou inferior a 10.

As 19 alterações genômicas significativamente recorrentes nas amostras de CDI (Tabela 3) foram comparadas com os dados clínicos e histopatológicos: idade, grau histológico, estadiamento clínico, tamanho do tumor (T), comprometimento de linfonodos (LN), status dos receptores ER, PR e HER-2, status do índice de proliferação Ki-67, desenvolvimento de metástase à distância e morte específica por CM. Além disso, curvas de sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida câncer-específica (SCC) foram construídas comparando todas as alterações genômicas.

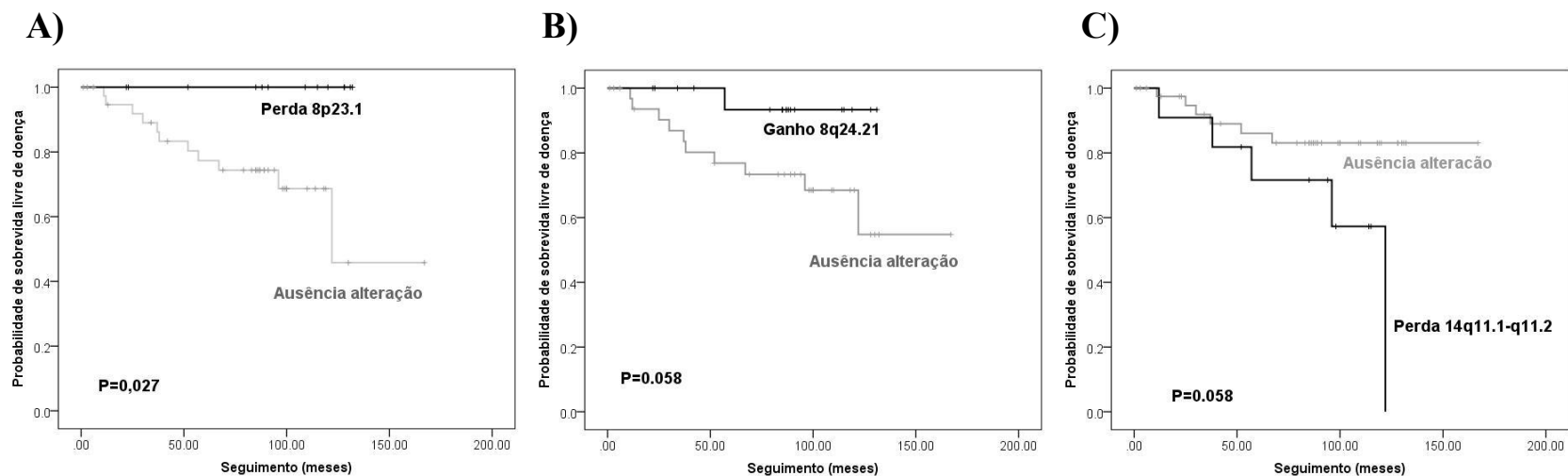
Ganhos simultâneos em 1q21.1 e 1q21.2 foram detectados em 14 casos (26%). Ganhos em 1q21.1-q21.2 foi significativamente associado com tumores ER-negativos ( $P=0,016$ ;  $OR=5,524$ ;  $IC95\%=1,443-21,15$ ). Além disso, observou-se uma associação marginalmente significativa entre ganhos em 1q22 e tumores ER-negativos ( $P=0,043$ ;  $OR=4,296$ ;  $IC95\%=1,175-15,71$ ). As demais alterações recorrentes do cromossomo 1 (perda 1p36.32 e ganhos em 1q32.1, 1q42.3 e 1q44) não mostraram qualquer associação significativa com as variáveis analisadas.

As análises realizadas de acordo com as alterações no cromossomo 8 mostraram uma tendência à associação significativa entre a perda em 8p23.1 e melhor evolução clínica. Pacientes com perda em 8p23.1 (presente em 13 casos) mostraram menor risco de desenvolver metástase durante o seguimento clínico ( $P=0,0474$ ,  $OR=0,09501$ ,  $IC95\%=0,005204-1,734$ ). Nenhum dos pacientes deste grupo desenvolveu metástase durante o seguimento clínico. Adicionalmente, maior tempo de sobrevida livre de doença foi detectado entre os pacientes cujos tumores apresentavam perdas nesta região ( $P=0,027$ ; Figura 3A). Por outro lado, perdas simultâneas nos três segmentos mapeados em 8p23.3 (Tabela 3) foram identificadas em 11 casos (21%) e associadas com características de pior prognóstico como: tumores grau III ( $P= 0,046$ ), HER2+ ( $P= 0,033$ ) e Ki-67 alto ( $P= 0,036$ ). Ganho em 8q24.21 foi a alteração mais frequentemente detectada entre os casos

estudados (19/53, 36%). Estas alterações foram associadas a tumores de grau III ( $P=0,0213$ ). Por outro lado, ganhos em 8q24.21 foram significativamente associados com menor risco de desenvolvimento de metástase em linfonodos ( $P=0,0199$ ,  $OR=0,2327$ ,  $IC95\%=0,06940-0,7804$ ). Embora não significativo, foi verificada uma menor proporção de casos com essas alterações entre pacientes que desenvolveram metástase à distância ( $P=0,0738$ ). Ganho em 8q24.21 estava associado com casos que apresentaram maior tempo de sobrevida livre de doença ( $P=0,058$ , Figura 3B). Nenhuma associação significativa foi observada entre a perda de 8p11.23 e as variáveis clínicas analisadas ou a sobrevida.

A perda em 14q11.1-q11.2 foi associada significativamente com características de pior prognóstico, como tumores de Grau III ( $P=0,0147$ ,  $OR=7,800$ ,  $IC95\%=1,484-40,99$ ) e Ki-67 alto ( $P=0,0096$ ;  $OR=8,0$ ,  $IC95\%=1,771-36,14$ ). Em adição, essa alteração associou-se com maior risco de desenvolvimento de metástase ( $P=0,0375$ ,  $OR=5,0$ ,  $IC95\%=1,151-21,71$ ) e uma tendência à significância para menor tempo de sobrevida livre de doença ( $P=0,058$ , Figura 3C).

---



**Figura 3.** Curva de sobrevida livre de doença de acordo com as alterações genômicas **A)** 8p23.1 (perda); **B)** 8q24.21 (ganho) e **C)** 14q11.1-q11.2 (perda). Valores de P foram determinados por *log-rank test*.

A perda em 18q23 associou-se significativamente com tumores PR- ( $P=0,0065$ ,  $OR=12,78$ ,  $IC95\%=1,493-109,3$ ). As demais alterações recorrentes como perda em 11q25, ganho em 15q11.2 e perda em 16q24.1 não mostraram associação significativa com nenhuma das variáveis analisadas ou com sobrevida.

## 5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES GENÔMICAS E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Foram realizadas análises com o intuito de identificar perfis genômicos de pior prognóstico em CDI, avaliando as alterações genômicas de acordo com as características clínicas e histopatológicas, tais como: *status* dos receptores ER, PR e HER2, acometimento linfonodal (LN) e desenvolvimento de metástases à distância (MD). Os perfis genômicos foram obtidos pela comparação entre a presença e ausência de cada característica especificada.

### 5.2.1 Receptor de estrógeno (ER)

Com intuito de identificar um perfil genômico associado ao status de ER, 52/53 casos com dados disponíveis foram analisados. Essa comparação permitiu a identificação de 62 regiões genômicas estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) entre o grupo ER+ (35 casos) e ER- (17 casos) (Figura 4). Cinquenta e cinco alterações genômicas (uma perda e 54 ganhos) foram observadas em ambos os grupos e se localizaram preferencialmente no cromossomo 1 (46 alterações). Por outro lado, sete alterações cromossômicas foram encontradas exclusivamente no grupo ER-, englobando os cromossomos 1, 15, 17 e 19 (Tabela 4), sendo que ganho em 17q12 estava presente em 41% dos casos ER-. Nos casos

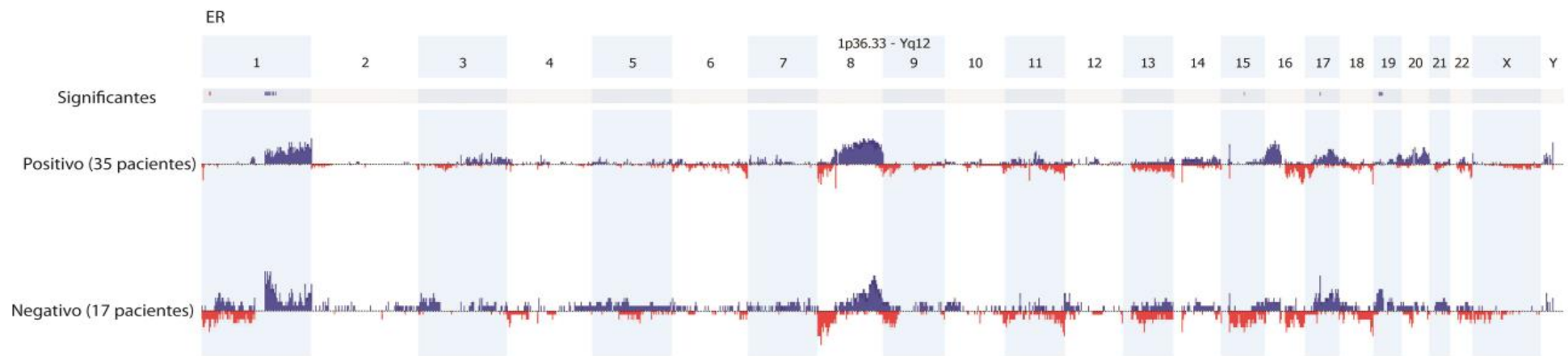


ER-, ganhos em 19p12 foram caracterizados pelo maior número de genes (8) alterados, incluindo um miRNA (hsa-mir-1270).

**Tabela 4.** Alterações genômicas exclusivas presentes nos carcinomas ductais invasivos ER negativos (n=17) em relação aos casos ER positivos (n=35) avaliados por *CGH-array*.

Localização	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)		P valor	% de cobertura por CNV*
				ER+	ER-		
<b>Cromossomo 1</b>							
p36.13	Perda	<i>DQ585677</i> , <i>NBPF1</i> , <i>CROCCP2</i> , <i>FLJ00313</i> , <i>MST1</i> , <i>MST1P2</i> , <i>ESPNP</i> , <i>AL035288</i>	-	0	29.41	0.0023	100
p36.13	Perda	<i>KIAA0445</i> , <i>CROCC</i>	-	0	29.41	0.0023	100
p36.13	Perda	<i>ACTL8</i> , <i>IGSF21</i> , <i>AX747631</i>	-	0	29.41	0.0023	33.68
<b>Cromossomo 15</b>							
q21.3	Perda	<i>UNC13C</i> , <i>DKFZp547H074</i> ,	-	0	29.41	0.0023	7.90
<b>Cromossomo 17</b>							
q12	Ganho	-	-	0	29.41	0.0023	22.85
q12	Ganho	<i>NEUROD2</i> , <i>PPP1R1B</i>	-	0	41.17	0.0001	82.52
<b>Cromossomo 19</b>							
p12	Ganho	<i>ZNF826</i> , <i>MIR1270-1</i> , <i>MIR1270-2</i> , <i>ZNF826P</i> , <i>ZNF737</i> , <i>ZNF626</i> , <i>ZNF66</i> , <i>ZNF85</i>	hsa-mir-1270	0	29.41	0.0023	89.26

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database of Genomic Variants* (DGV).



**Figura 4-** Comparação do perfil genômico dos 52 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao *status* do receptor de estrogênio (ER). Alterações nos cromossomos 1, 15, 17 e 19 foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) entre os dois grupos. A maioria das alterações observadas, principalmente no cromossomo 1, foi compartilhada entre ambos os grupos. Sete alterações foram específicas para os casos ER-, incluindo perdas em 1p36.13 e 15q21.3 e ganhos em 17q12 e 19p12. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (significantes). Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Positivo: ER+/35 casos, Negativo: ER-/17 casos.

### 5.2.2 Receptor de Progesterona (PR)

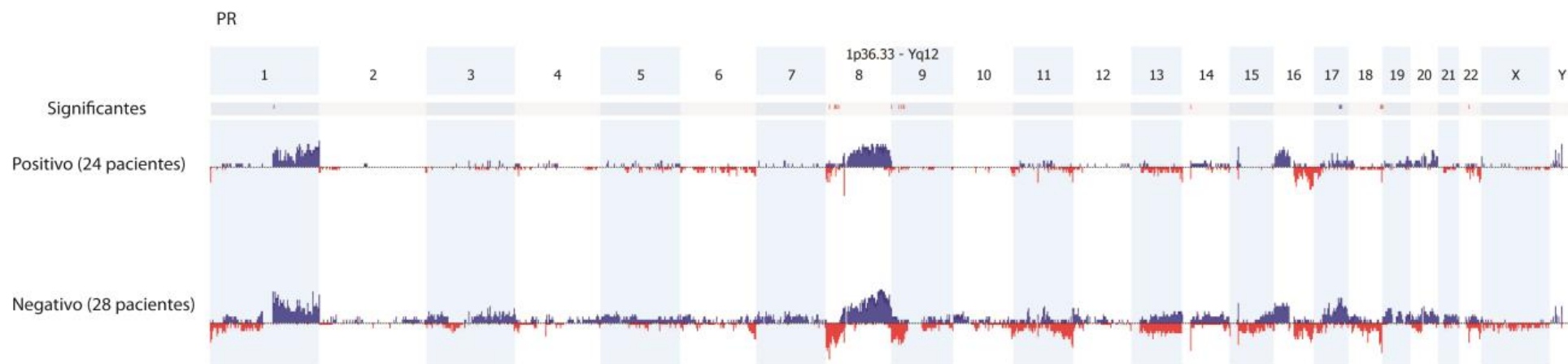
A análise segundo o status do receptor de progesterona (PR+ e PR-) resultou em 27 regiões genômicas (cinco ganhos e 22 perdas) estatisticamente diferentes entre os dois grupos ( $P > 0,05$ ) (Figura 5). Do total de alterações encontradas, 12 foram compartilhadas por ambos os grupos e 15 foram exclusivas do grupo PR-. As alterações encontradas em ambos os grupos se localizaram nos cromossomos 1, 14, 17 e 18. As perdas genômicas envolvendo principalmente 8p e 9p foram exclusivas do grupo PR- (Tabela 5). Perdas em 8p21.3-p21.2 englobaram o maior número de genes (34). Perdas em 8p21.3 e 14q11.2 foram observada em maior frequência (28,6%) nos casos PR- (Tabela 5).

---

**Tabela 5** - Alterações genômicas exclusivas presentes nos CDI que eram PR negativos (n=28) em relação aos casos PR positivos (n=24) avaliados por *CGH-array*.

Localização	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)		P valor	% de cobertura das CNV*
				PR+	PR-		
<b>Cromossomo 8</b>							
p23.1	Perda	-		0	25.00	0.0114	100.00
p22 - p21.3	Perda	<i>PSD3, LOC100128993, SH2D4A, ChGn, CSGALNACT1</i>		0	25.00	0.0114	34.94
p21.3	Perda	<i>INTS10, LPL</i>		0	25.00	0.0114	62.28
p21.3	Perda	16	hsa-mir-320a <sup>a</sup>	0	25.00	0.0114	100.00
p21.3	Perda	13		0	28.57	0.0051	100.00
p21.3 - p21.2	Perda	34		0	25.00	0.0114	44.29
p21.2	Perda	<i>STMN4</i>	hsa-mir-548h-4	0	25.00	0.0114	2.92
<b>Cromossomo 9</b>							
p24.3	Perda	<i>DMRT1, DMRT3, DMRT2</i>		0	25.00	0.0114	37.25
p22.2 - p22.1	Perda	<i>SH3GL2, MIR3152, ADAMTSL1</i>		0	25.00	0.0114	100.00
p21.3	Perda	16	hsa-mir-31	0	25.00	0.0114	34.58
p21.3 - p21.2	Perda	-		0	25.00	0.0114	0.00
p21.2	Perda	<i>C9orf72, CR613587, BX538226, LINGO2</i>		0	25.00	0.0114	11.66
<b>Cromossomo 14</b>							
q11.2	Perda	<i>OR4K1</i>		0	28.57	0.0051	100.00
<b>Cromossomo 18</b>							
q23	Perda	<i>LOC339298</i>		0	25.00	0.0114	10.67
<b>Cromossomo 22</b>							
q11.23	Perda	<i>GSTTP1, LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>		0	25.00	0.0114	100.00

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database of Genomic Variants* (DGV).



**Figura 5.** Comparação do perfil genômico geral para 52 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao *status* do receptor de progesterona (PR). Alterações nos cromossomos 1, 8, 9, 14, 17, 18, 19 e 22 foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos. Do total de 27 alterações observadas, 15 foram encontradas exclusivamente no grupo PR- e se localizaram principalmente nos braços curtos dos cromossomos 8 e 9. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (significantes). Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Positivo: PR+/24 casos, Negativo: PR-/28 casos.

### 5.2.3 Fator de crescimento epidérmico humano (HER2)

A comparação segundo o *status* do HER2 foi realizado para 49/53 casos avaliados por *CGH-array*. Esta análise evidenciou 64 regiões cromossômicas (25 ganhos e 39 perdas) que foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) entre os grupos HER2+ e HER2- (Figura 6). Noventa e duas regiões alteradas foram encontradas em ambos os grupos, englobando 40 ganhos e 52 perdas localizadas principalmente nos cromossomos 15 (20 alterações) e 9 (22 alterações). Alterações exclusivas envolvendo ganhos e perdas foram detectadas apenas nos casos HER2+ (Tabela 6), sendo que mais de 50% (39) destas se localizaram em 15q. As regiões de perdas (15q11.2-q12) e ganhos (15q26.3) no cromossomo 15 englobaram 119 genes cada, sendo que oito regiões estavam presentes em quase 43% dos casos HER2+.

---

**Tabela 6.** Alterações genômicas exclusivas presentes nos carcinomas mamários HER2 positivos (n=7) em relação aos casos HER2 negativos (n=42) avaliados por *CGH-array*.

Localização	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)		P valor	% de cobertura das CNV*
				HER2+	HER2-		
<b>Cromossomo 1</b>							
p35.2-p35.1	Ganho	45		28.57	0	0.0179	26.09
<b>Cromossomo 3</b>							
p26.2	Ganho	<i>SUMF1, SETMAR</i>		28.57	0	0.0179	100.00
<b>Cromossomo 4</b>							
q31.1	Ganho	<i>NAA15, NARG1, RAB33B, SETD7</i>		28.57	0	0.0179	87.35
<b>Cromossomo 5</b>							
q21.2-q21.3	Perda	<i>CR610784, RAB9BP1, RAB9BP1</i>		28.57	0	0.0179	100.00
<b>Cromossomo 6</b>							
q25.1-q25.2	Perda	<i>ESR1, FAS/ER, C6orf98, SYNE1, SYNE1, RP3-398G3.1, DKFZp781J13156, KIAA1756</i>		28.57	0	0.0179	20.64
<b>Cromossomo 9</b>							
q21.13	Ganho	<i>FAM108B1, C9orf85, C9orf57, GDA, KIAA1258, AK095210, ZFAND5</i>		28.57	0	0.0179	25.40
q21.31-q21.32	Ganho	<i>TLE1, CR614802, BC036431</i>		28.57	0	0.0179	100.00
q21.32 -q21.33	Ganho	<i>C9orf64, MIR7-1, CS266513, HNRPK, HNRNPK, RMI1, BX537783, CNT3, SLC28A3</i>	hsa-mir7-1	28.57	0	0.0179	100.00
q21.33	Ganho	<i>GOLM1, GK004</i>		28.57	0	0.0179	27.00
q22.1	Ganho	<i>SPIN1, NXNL2</i>		28.57	0	0.0179	65.32
q22.32	Ganho	<i>11</i>		28.57	0	0.0179	25.14
q22.32 - q22.33	Ganho	<i>HSD17B3, SLC35D2, HFRC, ZNF367, HABP4, CDC14B</i>		28.57	0	0.0179	28.40

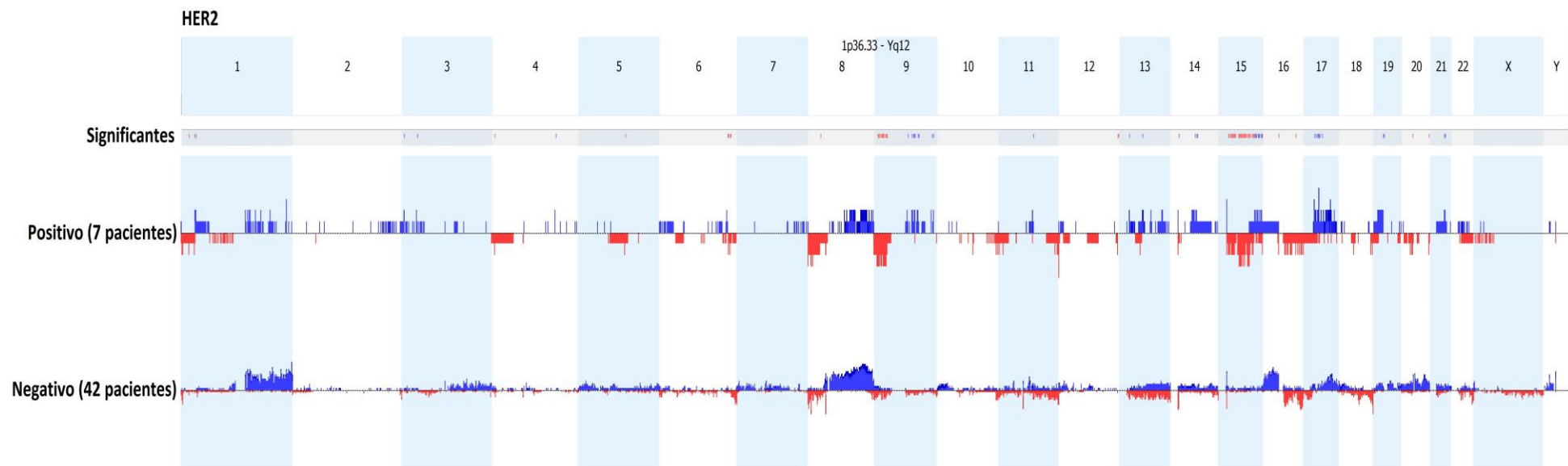
<b>Cromossomo 12</b>							
q24.33	Perda	<i>RAN, BC016143, ZC3H7B, AX748157, GPR133, DKFZp434B1272</i>	28.57	0	0.0179	14.22	
q24.33	Perda	-	28,57	0	0.0179	100.00	
<b>Cromossomo 13</b>							
q12.12	Ganho	<i>hTroy, TNFRSF19</i>	28.57	0	0.0179	100.00	
q14.3 - q21.1	Ganho	13	hsa-mir-1297	28.57	0	0.0179	12.27
<b>Cromossomo 15</b>							
q11.2-q12	Perda	119		28.57		0.0179	53.51
q12 - q13.1	Perda	<i>GABRG3, OCA2</i>	28.57	0	0.0179	71.54	
q14	Perda	<i>ATPBD4</i>	28.57	0	0.0179	6.69	
q14 - q15.1	Perda	<i>C15orf54, THBS1, FSIP1, GPR176, EIF2AK4, KIAA1338, SRP14, AK127696, LOC100131089</i>	28.57	0	0.0179	22.36	
q21.1	Perda	<i>FBN1</i>	28.57	0	0.0179	42.06	
q21.1	Perda	<i>CEP152, EID1, SHC4, SECISBP2L, KIAA0256, BX648602, COPS2, NDUFAF4P1, MIR4716, GALK2</i>	28.57	0	0.0179	8.66	
q21.1 - q21.2	Perda	<i>GALK2, FGF7, C15orf33, FAM227B, DTWD1, KIAA1939, ATP8B4</i>	42.86		0.0019	80.31	
q21.2	Perda	<i>KIAA1939, ATP8B4</i>	28.57	0	0.0179	1.39	
q21.2	Perda	<i>UNQ9339, GLDN, KIAA0856, DMXL2</i>	28.57	0	0.0179	100.00	
q21.2	Perda	<i>TMOD2, AB073658, TMOD3, CR621610, LEO1</i>	28.57	0	0.0179	17.71	
q21.3	Perda	14	28.57	0	0.0179	30.33	
q21.3	Perda	<i>CGNL1</i>	42.86	0	0.0019	100.00	
q22.1	Perda	<i>ALDH1A2, AQP9</i>	42.86		0.0019	5.59	
q22.1	Perda	-	28,57	0	0.0179	0.00	
q22.2	Perda	<i>CCNB2, cycB2, MYOE1</i>	28.57	0	0.0179	50.69	
q22.2	Perda	<i>FOXB1, ANXA2, BRCC1, NARG2,</i>	28.57	0	0.0179	13.74	



		<i>BC048264, BC035094, RORA</i>					
q22.2	Perda	<i>RORA</i>		42.86	0	0.0019	4.50
q22.2	Perda	<i>RORA, BC033962</i>		42.86	0	0.0019	38.02
q22.31	Perda	<i>USP3, BC017581, BC036918, AK093077, LOC100130855, FBXL22, AK091624, HERC1</i>	hsa-mir-422a	28.57	0	0.0179	7.92
q22.31 – q23	Perda	<i>LCTL, UNQ3022, BC016970, SMAD6, BX538221, SMAD3, DKFZp566A0646, FLJ11506, AAGAB, IQCH</i>		28.57		0.0179	17.44
q23	Perda	<i>FEM1B, ITGA11</i>		28.57	0	0.0179	100.00
q23	Perda	<i>29</i>	hsa-mir-629	42.86	0	0.0019	32.75
q23	Perda	<i>UACA, LARP6, THAP10, LRRC49</i>		28.57	0	0.0179	51.91
q23	Perda	<i>LRRC49</i>		42.86	0	0.0019	0.00
q23	Perda	<i>CT62, LOC196993</i>		28.57	0	0.0179	0.00
q23	Perda	<i>AF401215, BC043587, LOC645296, THSD4, UNQ9334</i>		42.86	0	0.0019	75.19
q23	Perda	<i>THSD4, UNQ9334</i>		28.57	0	0.0179	13.02
q24.1	Perda	<i>C15orf60, DKFZp566H1924, NPTN</i>		28.57	0	0.0179	3.36
q24.1	Perda	<i>25</i>		28.57	0	0.0179	92.59
q24.3 - q25.1	Perda	<i>PEAK1, HMG20A, BC042092, LOC253044, LINGO1, AK308609, DQ576146, LOC645752, LOC91450, TBC1D2B</i>		28.57	0	0.0179	25.76
q25.1	Perda	<i>MIR184, LOC729911, ANKRD34C, ALI09678, UNQ535, TMED3, KIAA1024</i>	hsa-mir-184	28.57	0	0.0179	60.37
q25.1 - q25.2	Perda	<i>14</i>	hsa-mir-	28.57	0	0.0179	20.24

549							
q25.2	Ganho	-		28.57	0	0.0179	11.47
q25.3	Ganho	<i>ZNF592, ALPK3, SLC28A1, PDE8A</i>		28.57	0	0.0179	68.35
q25.3	Ganho	<i>AGBL1</i>		28.57	0	0.0179	16.00
q26.1	Ganho	35		28.57	0	0.0179	13.84
q26.1 - q26.2	Ganho	<i>AK0944352, BC037497</i>		28.57	0	0.0179	73.77
q26.3	Perda	<i>MEF2A</i>		28.57	0	0.0179	12.58
q26.3	Perda	119	hsa-mir-1302-2	28.57	0	0.0179	91.66
<b>Cromossomo 17</b>							
q11.2	Ganho	<i>SUZ12, LRRC37B, SH3GL1P1, ARGFXP2, FLJ11040, RHOT1, RHBDL3, C17orf75</i>		28.57	0	0.0179	70.31
q11.2	Ganho	<i>PSMD11, CDK5R1, BX647207, MYO1D</i>		28.57	0	0.0179	13.28
q12	Ganho	<i>AP2B1</i>		28.57	0	0.0179	0.00
q12	Ganho	<i>ACACA</i>		28.57	0	0.0179	100.00
q21.2	Ganho	<i>TNS4, CR597260, CCR7, SMARCE1</i>		28.57	0	0.0179	29.24
q21.2	Ganho	43		28.57	0	0.0179	43.35
q21.31	Ganho	<i>DBF4B, ADAM11, GJC1</i>		28.57	0	0.0179	95.61
<b>Cromossomo 19</b>							
p12	Ganho	<i>ZNF675</i>		28.57	0	0.0179	100.00
<b>Cromossomo 20</b>							
q13.11	Perda	<i>CDH4, RP11-429E11.3-001, AK025855, MIR1257, TAF4</i>		28,57	0	0.0179	35.33

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database Genomic Variants* (DGV).



**Figura 6.** Comparação do perfil genômico geral em 49 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao *status* do HER2. Alterações nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21 e 22 foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos. Pode-se notar na figura um maior número de alterações nos cromossomos 9 e 15 que diferenciam HER+ de HER2-. Do total de 156 alterações observadas, 64 foram encontradas exclusivamente no grupo HER2+ e se localizaram principalmente em 15q. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (significantes). Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Positivo: HER2+/7 casos, Negativo: HER2-/42 casos.

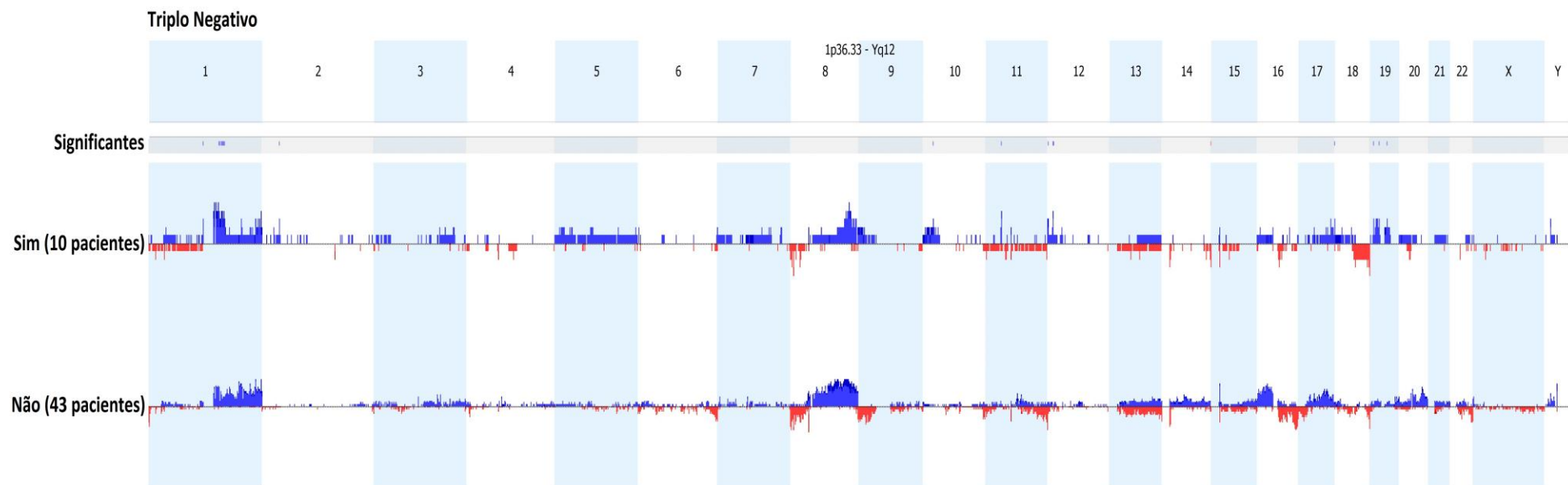
### 5.2.4 Amostras triplo-negativas (ER-, PR- e HER2-)

Considerando-se o comportamento agressivo dos CM triplo-negativos (ER-, PGR- e HER2-), foi realizada a comparação dos tumores triplo-negativos (TN) em relação aos demais com pelo menos um dos três receptores positivo (Figura 7). Foram identificadas 35 regiões diferenciais entre os dois grupos, envolvendo os cromossomos 1, 2, 10, 11, 12, 14, 18 e 19. Ganhos em 2p22.1 e 12p13.2 estavam presentes em mais de 33% dos casos TN (Tabela 7).

**Tabela 7**– Alterações genômicas exclusivas observadas nos casos triplo-negativos (n=10) e nos demais casos com pelo menos um dos três biomarcadores presentes (n=43).

Localização	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)		P valor	% de cobertura de CNV*
				Triplo-Negativo	Demais		
<b>Cromossomo 2</b>							
p22.1	Ganho	<i>ARL6IP2, ATL2, CR624999, DKFZp6671103, HNRPLL</i>		33.33	0	0.038	100
<b>Cromossomo 12</b>							
p13.2	Ganho	<i>ETV6, BCL2L14, LRP6</i>	hsa-mir-1244	33.33	0	0.038	3,56

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database of Genomic Variants* (DGV).



**Figura 7.** Comparação do perfil genômico de acordo com o padrão imunohistoquímico triplo-negativo (ER-, PGR- e HER2-) em relação às demais amostras com pelo menos um dos três biomarcadores presentes para todo o conjunto cromossômico. As regiões significativamente diferenciais exclusivas em casos triplo-negativos envolveram ganhos de 2p22.1 e 12p13.2. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas para cada grupo de CDI. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (*significant*), sendo a linha vermelha (perdas) direcionada abaixo de 0% para triplo-negativo e acima para as demais combinações e a linha azul (ganhos) direcionada acima de 0% para triplo-negativo e abaixo para as demais combinações imunohistoquímicas. Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Sim: triplo-negativos/10 casos, Não: demais combinações/43 casos.

### 5.2.5 Acometimento linfonodal (LN)

Foi realizada a comparação do padrão de alterações genômicas encontrado entre os grupos de CDI linfonodo-positivos (LN+/35 casos) e negativos (LN-/18 casos). A busca por regiões com perdas ou ganhos genômicos capazes de distinguir os dois grupos resultou na detecção de alterações com diferença significativa entre as amostras de LN+ e LN- ( $P < 0,05$ ; Figura 8). Foram identificadas 48 regiões cromossômicas (38 ganhos e 10 perdas) capazes de distinguir os dois grupos avaliados, incluindo ganhos envolvendo os cromossomos 1 e 8 e perdas nos cromossomos 10 e 22 e em 8p12-p22. Do total de alterações observadas na análise comparativa, 67% (32/48) foram compartilhadas pelos dois grupos, enquanto, 31% foram exclusivas para os tumores LN+ (11/38) e 0,4% (1/48) exclusivas nos casos LN-.

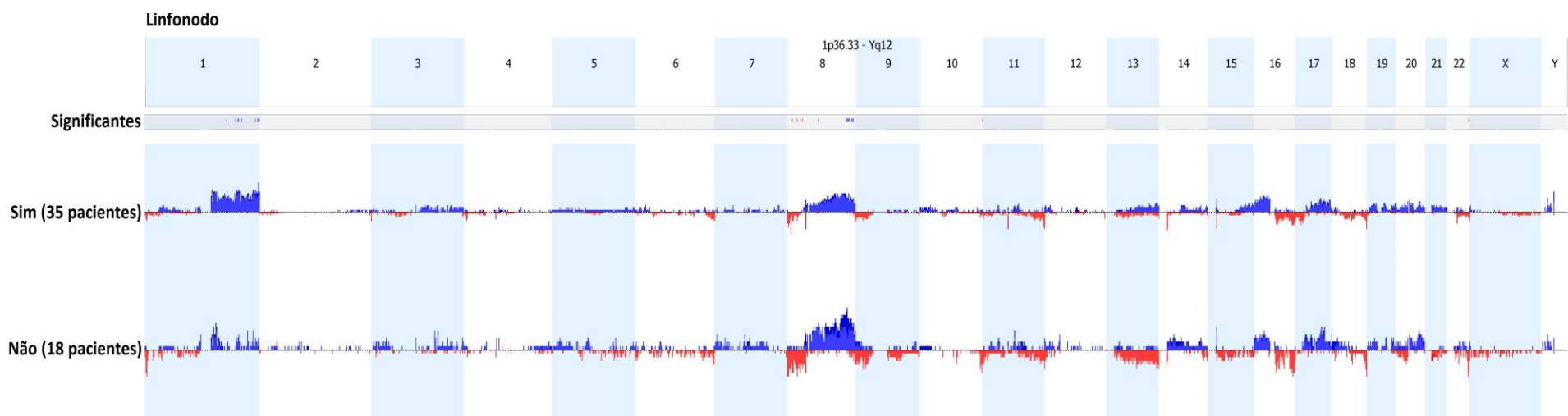
Os ganhos envolvendo o braço longo do cromossomo 1, particularmente 1q25.2, 1q32.1 e 1q44, estavam presentes em mais de 26% dos casos LN+ e ausente nos casos LN-. A descrição detalhada das alterações genômicas presentes nestas regiões está listada na Tabela 8. Embora, em menor número, também foi observada uma alteração específica para o grupo das amostras LN- envolvendo perdas em 8p12 (28% dos casos).

---

**Tabela 8.** Alterações genômicas exclusivas presentes nos casos CDI com relação a acometimento linfonodal (n=53) avaliados por *CGH-array*.

Localização	Evento	Genes	miRNA	Frequência (%)		P valor	% de cobertura de CNV*
				LN+	LN-		
<b>Cromossomo 1</b>							
q25.2	Ganho	<i>RASAL2, C1orf49, TEX35, DKFZp564J047</i>	hsa-mir-1204	25.71	0	0,0205	25.12
q25.2	Ganho	<i>DKFZp564J047, C1orf220, RALGPS2</i>	hsa-miR4424	28.57	0	0,0108	16,57
q25.2	Ganho	<i>RALGPS2, ANGPTL1</i>		25.71	0	0,0205	2,10
q31.3	Ganho	<i>CFH</i>		25.71	0	0,0205	100
q32.1	Ganho	<i>14</i>		25.71	0	0,0205	0,74
q32.1	Ganho	<i>FMOD, PRELP</i>		25.71	0	0,0205	0,00
q32.1	Ganho	<i>MDMX, MDM4, LRRN2</i>		31.42	0	0,0096	1,37
q32.1	Ganho	<i>MDM4, LRRN2, NFASC</i>		28.57	0	0,0108	4.32
q32.1	Ganho	<i>NFASC, KIAA0756, AX746920, DKFZp781D102, CNTN2, TMEM81, RBBP5</i>		31.42	0	0,0096	0,88
q32.2	Ganho	<i>KCNH1</i>		25.71	0	0,0205	0,00
q44	Ganho	<i>KIF26B</i>		25.71	0	0,0205	100,00
q44	Ganho	<i>SMYD3</i>		25.71	0	0,0205	87,77
q44	Ganho	<i>OR2L13</i>		25.71	0	0,0205	100
q44	Ganho	-		28.57	0	0,0108	100
q44	Ganho	<i>OR2T27</i>		28.57	0	0,0108	100
<b>Cromossomo 8</b>							
p12	Perda	<i>NRG1</i>		0	27.78	0,0029	0.00

Legenda: CNV\*- análise de CNV baseada no *Database of Genomic Variants* (DGV).



**Figura 8.** Comparação do padrão geral de alterações em todo o conjunto cromossômico (ch1 - ch22) para os 53 casos de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) com relação ao acometimento linfonodal. Alterações envolvendo ganhos nos cromossomos 1 e 8 assim como, a perda nos cromossomos 8, 10 e 22 foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos. A maioria das alterações observadas na análise comparativa foi específicas para os casos linfonodo positivos (N+), incluindo os ganhos envolvendo 1q25.2, 1q32.1 e 1q44. A perda em 8p12 foi específica para o grupo linfonodo-negativo (N-). As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas para cada grupo de CDI. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (*significant*), sendo a linha vermelha (perdas) direcionadas abaixo de 0% para N+ e acima para N-, e a linha azul (ganhos) direcionada acima de 0% para N+ e abaixo para N- . Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Sim: N+/35 casos, Não: N-/18 casos.



### **5.2.6 Desenvolvimento de Metástase à distância (MD)**

Para identificar a existência de um perfil genômico associado com metástase à distância (MD) foram comparados os pacientes que desenvolveram metástase à distância (MD+: 11 casos) e pacientes que com boa evolução clínica (MD-: 42 casos). Foram identificadas 34 regiões diferenciais, das quais apenas a perda em 14q11.2 foi compartilhada pelos dois grupos (Figura 9). Todos os ganhos exclusivos aos casos MD- foram observadas no cromossomo 8 (33 alterações), particularmente envolvendo a região 8q21.13-q22.2 (Tabela 9).

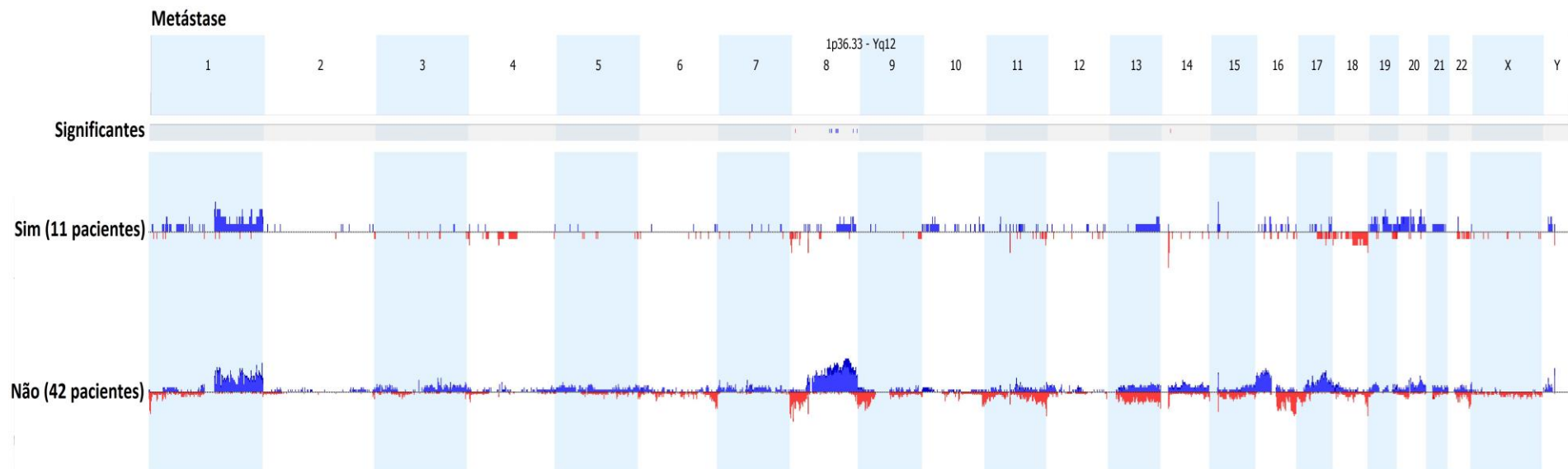
---

**Tabela 9.** Alterações genômicas exclusivas em pacientes com carcinoma mamário de acordo com a presença ou ausência de metástase à distância.

Localização	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)		P valor	% de cobertura de CNV*
				MD+	MD-		
<b>Cromossomo 8</b>							
p23.1	Perda	<i>LOC349196, DEFB109, AK307331, FAM66B, USP17L1P, USP17L4</i>		0	30.95	0.0474	100.00
q21.13	Ganhos	<i>STMN2, CR609420</i>		0	30.95	0.0474	4.62
q21.13	Ganhos	<i>MRPS28, TPD52, PC-1</i>	<i>hsa-mir5708</i>	0	30.95	0.0474	2.36
q21.13	Ganhos	<i>ZBTB10, LOC389672, ZNF704</i>		0	33.33	0.0261	1.13
q21.13	Ganhos	<i>ZNF704</i>		0	30.95	0.0474	0.00
q21.13	Ganhos	<i>PMP2, FABP9, FABP4, FABP12</i>		0	30.95	0.0474	1.78
q21.2	Ganhos	<i>RALYL, KIAA1764, LRRCCI, E2F5, AB209185, C8orf59, CA13, CA3, CAI</i>		0	30.95	0.0474	24.72
q21.2	Ganhos	<i>REXO1L1, REXO1L2P</i>		0	30.95	0.0474	100.00
q21.2 - q21.3	Ganhos	<i>PSKH2, ATP6V0D2, SLC7A13</i>		0	33.33	0.0261	64.87
q22.1	Ganhos	<i>LINC00535, FAM92A1, RBM12B, RBM12B-ASI, TMEM67, MIR378D2, PDP1, PPM2C</i>		0	30.95	0.0474	2.09
q22.1	Ganhos	<i>CDH17</i>		0	33.33	0.0261	0.00
q22.1	Ganhos	<i>CDH17, GEM, RAD54B,</i>		0	35.71	0.0228	9.77

		<i>FSBP,</i> <i>KIAA1429</i>					
q22.1	Ganhos	<i>KIAA1429,</i> <i>LOC10028874</i> <i>8, RBM35A,</i> <i>ESRP1,</i> <i>DPY19L4,</i> <i>INTS8,</i> <i>CCNE2,</i> <i>p53DINP1,</i> <i>TP53INP1,</i> <i>C8orf38</i>	0	33.33	0.0261	11.93	
q22.1	Ganhos	<i>C8orf38,</i> <i>NDUFAF6,</i> <i>AX747981,</i> <i>MIR3150B,</i> <i>MIR3150A,</i> <i>PLEKHF2,</i> <i>C8orf69,</i> <i>C8orf37</i>	0	30.95	0.0474	22.99	
q22.1	Ganhos	<i>C8orf37,</i> <i>LOC10061653</i> <i>0</i>	0	33.33	0.0261	0.00	
q22.1	Ganhos	<i>LOC10061653</i> <i>0,</i> <i>LOC10050077</i> <i>3</i>	0	30.95	0.0474	19.49	
q22.1	Ganhos	<i>MTERFD1,</i> <i>PTDSS1</i>	0	30.95	0.0474	0.48	
q22.1	Ganhos	<i>CPQ, PGCP</i>	0	30.95	0.0474	1.74	
q22.1	Ganhos	<i>TSPYL5</i>	0	30.95	0.0474	1.27	
q22.1	Ganhos	<i>MTDH</i>	0	30.95	0.0474	100.00	
q22.1 - q22.2	Ganhos	<i>11</i>	0	30.95	0.0474	7.49	
q22.2	Ganhos	<i>STK3</i>	0	30.95	0.0474	0.00	
q22.2	Ganhos	<i>STK3, OSR2,</i> <i>VPS13B</i>	hsa-mir-599, hsa-mir-875	0	33.33	0.0261	68.72
q22.2	Ganhos	<i>VPS13B</i>		0	35.71	0.0228	100.00
q22.2 - q22.3	Ganhos	<i>14</i>	hsa-mir-1273	0	30.95	0.0474	7.84
q24.22	Ganhos	<i>PHF20L1, TG</i>		0	30.95	0.0474	23.11
q24.3	Ganhos	<i>DKFZp666O0</i> <i>110, PTK2</i>		0	30.95	0.0474	0.00

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database Genomic Variations* (DGV).



**Figura 9.** Comparação do perfil genômico de acordo com presença (MD+) ou ausência de metástase à distância (MD-) para todo o conjunto cromossômico. As regiões significativamente diferenciais exclusivas em casos que não apresentaram metástase a distância envolveram somente o cromossomo 8. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas para cada grupo de CDI. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (*significant*), sendo a linha vermelha (perdas) direcionadas abaixo de 0% para MD+ e acima para MD-, e a linha azul (ganhos) direcionada acima de 0% para MD+ e abaixo para MD-. Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Sim: MD+/11 casos, Não: MD-/42 casos.

### 5.2.7 Comparação de tumores linfonodo +/-metástase + versus linfonodo +/-metástase

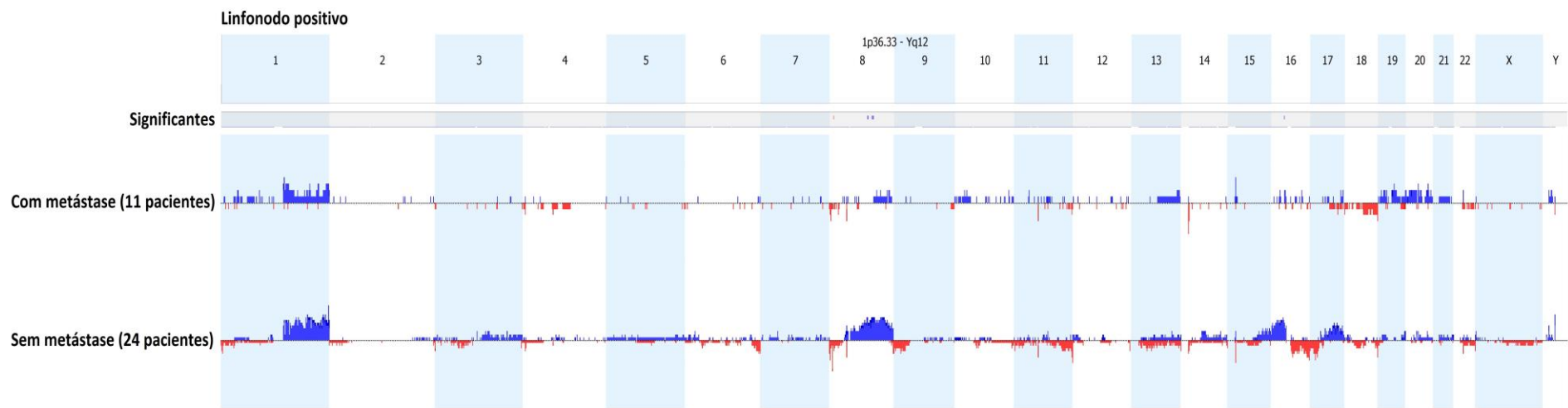
No presente estudo, 52/53 amostras de CDI tinham informações disponíveis quanto ao status linfonodal. Destas, 33 (63%) apresentaram comprometimento de linfonodos (LN+) e 11/33 (33%) apresentaram metástase à distância durante o seguimento clínico. As pacientes sem comprometimento linfonodal não desenvolveram metástases durante o período. Assim, a presente análise teve como objetivo discriminar as alterações cromossômicas diferenciais de tumores LN+ que evoluíram com metástase à distância (MD+) daqueles com bom seguimento clínico (MD-). Esta análise identificou sete alterações genômicas que foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre estes grupos (Figura 10), incluindo alterações (seis ganhos e uma perda) que foram exclusivas para o grupo LN+/MD- e estavam presentes em 33% desses casos (Tabela 10). Seis destas alterações estavam mapeadas no cromossomo 8 e uma no cromossomo 16.

---

**Tabela 10.** Alterações genômicas exclusivas presentes nos carcinomas ductais invasivos LN+/MD+ (n=11) em relação aos casos LN+/MD- (n=22) avaliados por *CGH-array*.

Localização	Evento	Gene	miRNAs	Frequência (%)		P value	% de cobertura de CNV*
				LN+/MD+	LN+/MD-		
<b>Cromossomo 8</b>							
p23.1	Perda	<i>LOC349196, DEFB109, AK307331, FAM66B, USP17L1P, USP17L4</i>		0	33.33	0.03701	100
q21.2	Ganho	<i>RALYL, KIAA1764, LRRCCI, E2F5, AB209185, C8orf59, CA13, CA3, CA1</i>		0	33.33	0.03701	24.72
q21.2 - q21.3	Ganho	<i>PSKH2, ATP6V0D2, SLC7A13</i>		0	33.33	0.03701	60.36
q22.1	Ganho	22		0	33.33	0.03701	12.82
q22.1	Ganho	<i>CPQ, PGCP, TSPYL5, MTDH</i>		0	33.33	0.03701	15.31
q22.2	Ganho	<i>STK3, OSR2, VPS13B</i>	hsa-mir-599, hsa-mir-875	0	33.33	0.03701	63.53
<b>Cromossomo 16</b>							
p11.2	Ganho	<i>XPO6, AX746995, SBK1, NPIPL1, EIF3C, EIF3CL</i>		0	33.33	0.03701	100

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database of Genomic Variants* (DGV); LN: acometimento linfonodal; MD: metástase à distância; +: presença; -: ausência



**Figura 10.** Comparação do perfil genômico em 33 casos de carcinomas ductais invasivos de mama (CDI) quanto ao comprometimento de linfonodos e metástases a distância (LN+/Met+) e com linfonodos comprometidos na ausência de metástases a distância (LN+/MD-). Foram observadas apenas alterações estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) nos cromossomos 8 (6) e 16 (1), todas exclusivas do grupo LN+/MD-. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (significantes). Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 7.0*. Positivo: LN+MD+ 11 casos, Negativo: LN+MD- 22 casos.

### 5.3 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS BASEADA NO PADRÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS

Com o objetivo de verificar se há um perfil genômico específico capaz de distinguir subgrupos tumorais com alterações associadas à características clinico-patológicas semelhantes, foi realizada a análise de agrupamento hierárquico não supervisionado nas amostras de carcinoma ductal invasivo. Esta análise permitiu a classificação das amostras com perfis similares utilizando algoritmos específicos (*Complete Linkage Hierarchical Clustering Algorithm*).

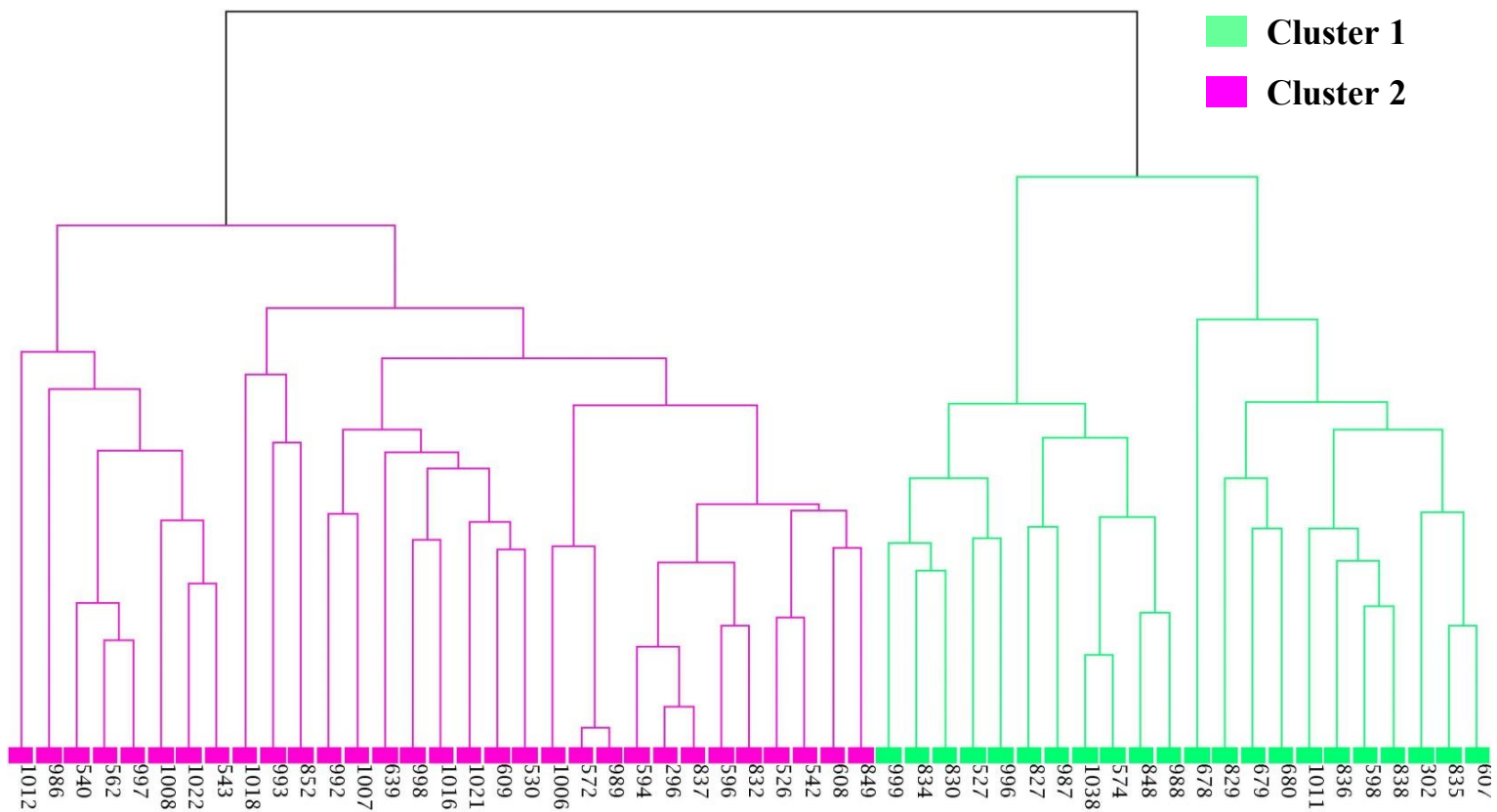
Esta análise revelou dois grupos segundo o padrão de alterações: *cluster 1* (22 casos) e *cluster 2* (31 casos) (Figura 11). A comparação entre os *clusters 1* e *2* revelou alterações distintas como ganhos significativos em 3q, 8q, 11q, 17q, 19q e 20q e perdas em 4q, 8p, 15q e 16q (Figura 12). Entre as 319 alterações genômicas diferenciais detectadas na comparação entre os dois *clusters*, 303 foram exclusivas para o *cluster 2* (presentes em >19% dos casos), incluindo os ganhos em 3q23, 11q14.1, 17q12-q21.1 e 20q11.22-q11.23 e perdas em 4q13.2, 8p21.2, 16q12.1 e 16q13. Outra alteração compartilhada especificamente pelas amostras do *cluster 2* envolveu o braço longo do cromossomo 8. Nesta região de aproximadamente 2 Mb (8p11.21-q24.3), 47 alterações envolvidas em ganhos genômicos foram detectadas em mais de 50% dos casos presentes no *cluster 2* (Tabela 11).

Observou-se uma tendência a associação entre o *cluster 2* e tumores grau III (P=0,0494). Foi verificada uma associação entre o *cluster 2* e Ki-67 alto, porém sem significância estatística (P=0,0729). Dados da literatura indicam que tumores de grau baixo (I-II), Ki-67 negativo ou baixo e ER-positivo apresentam melhor prognóstico (baixo risco) em comparação com os demais (Strand et al., 2013). A comparação entre os *clusters* e as

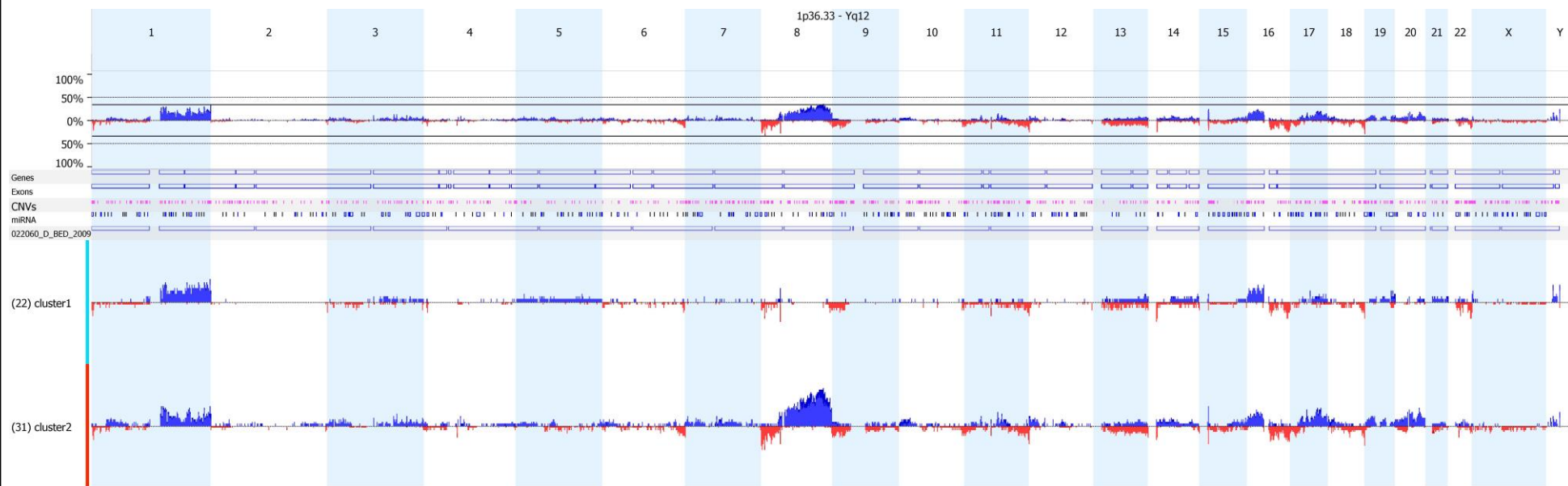


características citadas acima revelou uma associação significativa entre tumores de baixo risco (Grau I-II; Ki-67 negativo/baixo e ER+) e o *cluster* 1 (P=0,0122, OR=4,667; IC95%=1,409 - 15,45). Não foram observadas outras associações significativas incluindo as análises de sobrevida livre de doença e câncer-específica.

---



**Figura 11.** Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado realizada nas 53 amostras de CDI baseada no perfil de alterações genômicas encontrado em cada caso. A análise dividiu os casos em dois grupos denominados *Cluster 1* (22 casos) e *Cluster 2* (31 casos) representados pelas cores verde e rosa, respectivamente. Adaptação de imagem obtida no *software Nexus version 7.0*.



**Figura 12.** Representação gráfica da comparação do padrão de alterações genômicas para *cluster 1* (22 casos) e *cluster 2* (31 casos). Ganhos envolvendo o cromossomo 8 foram exclusivos para o *cluster 2*. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. As alterações significativas na comparação serial entre os *clusters* estão indicadas na barra superior (\*). Adaptação das imagens obtidas no *software Nexus 7.0*.

**Tabela 11.** Alterações envolvidas em ganhos no cromossomo 8 exclusivas do *cluster 2* presentes nos carcinomas ductais invasivos.

Localização	Evento	Gene	miRNAs	Frequência (%)		P value	% de cobertura das CNV*
				Cluster1	Cluster2		
<b>Cromossomo 8</b>							
q22.3	Ganho	<i>AX746867, YWHAZ, FLJ42969, ZNF706</i>		0	51.61	0.00003	23.84
q22.3	Ganho	<i>FKSG17, NACAP1, GRHL2, NCALD</i>		0	54.84	0.00001	11.99
q22.3	Ganho	<i>NCALD</i>		0	51.61	0.00003	37.18
q22.3	Ganho	<i>7</i>		0	51.61	0.00003	0.80
q22.3	Ganho	<i>KIAA0896, UBR5, ODF1, KLF10</i>		0	54.84	0.00001	78.24
q22.3	Ganho	<i>CR608006, AZINI, ATP6V1C1</i>		0	51.61	0.00003	100.00
q23.3	Ganho	-		0	51.61	0.00003	100.00
q23.3	Ganho	-		0	51.61	0.00003	6.43
q23.3	Ganho	-		0	54.84	0.00001	84.11
q23.3	Ganho	-		0	51.61	0.00003	14.95
q23.3	Ganho	<i>TRPS1</i>		0	54.84	0.00001	14.17
q23.3	Ganho	<i>LINC00536</i>		0	51.61	0.00003	79.36
q23.3 - q24.11	Ganho	<i>LINC00536</i>		0	54.84	0.00001	30.96
q24.11	Ganho	<i>EIF3H, UTP23</i>		0	51.61	0.00003	9.88
q24.11	Ganho	<i>7</i>		0	51.61	0.00003	0.99
q24.11	Ganho	<i>SLC30A8, MED30</i>		0	54.84	0.00001	2.19
q24.11	Ganho	-		0	51.61	0.00003	0.00
q24.12	Ganho	<i>SAMD12</i>		0	51.61	0.00003	1.91
q24.12	Ganho	<i>SAMD12, SAMD12-ASI</i>		0	54.84	0.00001	3.54
q24.12	Ganho	<i>TNFRSF11B</i>		0	58.06	0.00000	20.37
q24.12	Ganho	<i>TNFRSF11B, COLEC10, MAL2, NOV, ENPP2</i>		0	54.84	0.00001	42.84
q24.12	Ganho	<i>TAF2, DSCC1, DEPDC6, DEPTOR</i>		0	58.06	0.00000	1.31
q24.12	Ganho	<i>DEPDC6, DEPTOR, COL14A1</i>		0	54.84	0.00001	0.00
q24.12	Ganho	<i>COL14A1, MRPL13, MTBP</i>		0	58.06	0.00000	5.39
q24.12	Ganho	<i>MTBP, SNTB1</i>		0	54.84	0.00001	2.58
q24.12	Ganho	<i>SNTB1, AK057448</i>		0	51.61	0.00003	34.34
q24.12	Ganho	-		0	54.84	0.00001	24.79
q24.12 - q24.13	Ganho	<i>DQ589334, HAS2, HAS2AS, HAS2-ASI</i>		0	58.06	0.00000	8.10
q24.13	Ganho	<i>BC052578</i>		0	54.84	0.00001	41.42

q24.13	Ganho	<i>BC052578, ZHX2</i>		0	51.61	0.00003	3.14
q24.13	Ganho	<i>ZHX2, DERL1, WDR67, FAM83A</i>		0	58.06	0.00000	0.00
q24.13	Ganho	<i>16</i>	hsa-mir-548d-1	0	54.84	0.00001	0.00
q24.13	Ganho	<i>8</i>		0	51.61	0.00003	3.36
q24.13	Ganho	<i>MTSS1</i>		0	51.61	0.00003	10.59
q24.13	Ganho	<i>13</i>		0	58.06	0.00000	0.69
q24.13	Ganho	<i>NSMCE2</i>		0	54.84	0.00001	0.00
q24.13 - q24.21	Ganho	<i>14</i>		0	58.06	0.00000	84.23
q24.21	Ganho	<i>DQ515897, LOC727677</i>		0	61.29	0.00000	100.00
q24.21	Ganho	<i>8</i>	hsa-mir-1204, hsa-mir-1205, hsa-mir-1206, hsa-mir-1207	0	54.84	0.00001	100.00
q24.21	Ganho	-	hsa-mir-1208	0	51.61	0.00003	100.00
q24.21	Ganho	<i>BC009730, BC014119</i>		0	51.61	0.00003	100.00
q24.21	Ganho	<i>GSDMC</i>		0	51.61	0.00003	3.54
q24.21	Ganho	<i>ASAPI, DDEF1IT1, ASAPI-IT1, DDEF1</i>		0	51.61	0.00003	0.65
q24.21 - q24.22	Ganho	<i>ASAPI, DDEF1</i>		0	54.84	0.00001	0.28
q24.22	Ganho	-		0	51.61	0.00003	0.00
q24.22	Ganho	<i>ADCY8</i>		0	51.61	0.00003	19.19

Legenda: CNV (DGV)\*- análise de CNV baseada no *Database of Genomic Variants* (DGV).



## 6 DISCUSSÃO

A técnica de aCGH tem sido amplamente utilizada na caracterização de alterações genômicas associadas com estágios precusores do carcinoma de mama, bem como na avaliação da progressão tumoral e na identificação de regiões associadas com a resistência à terapia. A relevância da análise de alterações genômicas nos carcinomas de mama foi reforçada pelos resultados de um estudo recente que avaliou aproximadamente 10.000 tumores de 12 tipos diferentes, incluindo carcinomas de mama (N=488). Neste estudo buscou-se identificar assinaturas oncogênicas. A análise integrada entre o número de cópias genômicas, mutações em regiões codificadoras detectadas por sequenciamento de exoma e o perfil de metilação revelou duas classes de tumores, designados como classe M ou classe C quando as alterações mais prevalentes eram mutações (M) ou alterações no número de cópias (C), respectivamente. A grande maioria dos carcinomas de mama classificou-se no grupo C, ou seja, cujas alterações mais relevantes eram de números de cópias genômicas (Ciriello et al., 2013). Este estudo reforça, portanto, a importância em se estudar estas alterações em carcinomas mamários.

Apesar da importância da caracterização de alterações genômicas dos carcinomas de mama, para o nosso conhecimento, há poucos relatos em tumores esporádicos de pacientes brasileiras, e na sua maioria, estes estudos utilizaram CGH convencional (Cavalli et al., 2003; Santos et al., 2008). Há um estudo que utilizou aCGH, porém com o objetivo de avaliar se a ausência da expressão da proteína ANAPC13, detectada pelos autores nos carcinomas de mama invasivos, poderia ser resultado da perda da região cromossômica contendo o gene *ANAPC13* (Sens-Abuázar et al., 2012). Assim, no sentido de identificar alterações genômicas relevantes na carcinogênese mamária, o presente

---

estudo avaliou 53 carcinomas ductais invasivos de pacientes brasileiras com longo seguimento clínico.

As análises mostraram alterações genômicas não casuais as quais foram comparadas com várias características clínicas e perfis hormonais baseados em análises da sua expressão por imunohistoquímica. Várias regiões genômicas alteradas contendo micro-RNAs não serão discutidas aqui pelo fato da metodologia usada não apresentar resolução suficiente para identificar regiões envolvendo micro-RNAs. A plataforma usada continha apenas uma sonda para cada um dos miRs.

A análise do perfil global de alterações no número de cópias genômicas nos CM revelou 3.849 alterações, com média de 72,6 alterações por caso e com semelhante proporção de ganhos e perdas genômicas. Santos et al. (2008) avaliaram 20 casos pareados de tumores primários mamários e suas metástases em linfonodos sentinelas pelo método de CGH cromossômico. A análise dos tumores revelou 220 alterações no número de cópias genômicas, com média de 11 alterações por caso. A comparação entre nossos dados e os resultados deste estudo denota a superioridade da metodologia de aCGH em detectar alterações genômicas em amostras tumorais. Na aCGH, o princípio metodológico é semelhante ao da CGH cromossômico, superando, entretanto, as limitações de resolução pelo uso de clones ou sequências das regiões codificadoras e/ou não-codificadoras dos genes de interesse immobilizados em uma lâmina de vidro em posições bem definidas.

No presente estudo foram identificadas 19 alterações cromossômicas recorrentes significativas envolvendo os cromossomos 1, 8, 11, 14, 15, 16 e 18. As alterações mais frequentes foram ganhos em 8q24.21 (36%) e 1q44 (32%), assim como a perda em 8p11.23 (28%) .

Santos et al. (2008) relataram maior número de alterações nos cromossomos 1 (10%), 20 (9,1%) e 16 (8,2%) e menor número de alterações envolvendo os cromossomos

---



10 e 14 (1,4% cada). Bergamaschi et al. (2006) analisaram CNAs em 89 tumores de mama localmente avançados e detectaram que as alterações mais frequentes nestes tumores incluíam ganhos em 1q (35% dos casos), 8q (35%) e perdas em 8p (48%), e 14q (48%). No presente estudo as alterações mais prevalentes foram ganhos em 1q44 e 8q24.21 (32% e 36% dos casos, respectivamente); assim como a perda em 8p11.23 (28,3%).

Ganhos em 1q (contendo 81 genes) foram identificadas em pelo menos 28% dos tumores avaliados. Alterações em 1q têm sido frequentemente descritas em CM, sendo o ganho a alteração mais comumente encontrada (Tirkkonen et al., 1998; Rennstam et al., 2003; Orsetti et al., 2006; Bergamaschi et al., 2006; Carracedo et al., 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2012), ao passo que em 1p as perdas são mais prevalentes (Orsetti et al., 2006). Concordante com estes achados, o presente estudo mostrou ganhos em 1q21.1, 1q21.2, 1q22, 1q32.1 1q42.3 e 1q44. Além disso, estes achados corroboram os resultados de Orsetti et al. (2006). Os autores utilizaram uma plataforma de BACs para avaliar especificamente as alterações genômicas no cromossomo 1 em 30 tumores primários de mama e 30 linhagens tumorais mamárias. Nesse estudo, as alterações mais prevalentes foram ganhos em 1q21-q22, 1q23-q24, 1q32 e 1q42-q44; as perdas em 1q foram eram notavelmente raras (Orsetti et al., 2006).

As alterações descritas no cromossomo 1 envolveram vários genes que podem ter importância funcional no processo tumoral. No entanto, é um grande desafio identificar com precisão as consequências funcionais de ganhos ou perdas de regiões do genoma que abrigam dezenas a centenas de megabases e que podem afetar milhares de genes.

Mesquita et al. (2013) analisaram 141 casos de CM por CGH cromossômico e identificaram alta frequência de ganhos em 1q21 e 1q32 (56,7%). Na busca por genes alterados mapeados nessas regiões e relevantes para a carcinogênese mamária, os autores avaliaram três *loci* de genes *ETS* [*Fatores de transcrição a partir do retrovírus aviário E*

---

*Twenty six (E26)*] e concluíram que o ganho estava associado com o aumento de expressão dos fatores de transcrição *ETS*: *ETV3* e *ELF3*, mas não *ELK4*. Os autores sugeriram que, dentre estes genes, o gene *ELF3* é o provável candidato associado com a carcinogênese mamária.

O ganho em 1q22 foi detectado em 28% dos casos aqui estudados. Nessa região está mapeado *RAB25 (Ras-related protein 25)* o qual já foi descrito como associado à agressividade do tumor de mama e de ovário (Cheng et al., 2003) e, mais recentemente, à metástase linfática de CM (Yin et al., 2012).

Ganho em 1q42.3 foi observado em 28,3% dos casos. Nesta região está mapeado o gene *ARID4B (AT rich interactive domain 4B - RBP1-like)*. A expressão aumentada desse gene foi associada com pior evolução clínica, principalmente em pacientes com tumores ER+ (Winter et al., 2012). Assim, a continuidade deste estudo avaliando, por outras estratégias, os genes mapeados nestas regiões alteradas poderá confirmar o seu papel na carcinogênese mamária.

O cromossomo 8 apresentava o maior número de ampliações (74) detectadas entre as amostras estudadas. Ganhos em 8q24.21 foi a alteração mais frequentemente detectada (36% dos casos). Estudos recentes demonstraram ganhos nesta região em carcinomas mamários (Carracedo et al., 2012, The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Em 8q24.21 estão mapeados 8 genes, incluindo o oncogene *MYC*, que já foi mostrado estar amplificado em uma fração dos carcinomas de mama (Deming et al., 2000; Nair et al., 2013). O estudo descrito anteriormente de assinaturas oncogênicas entre 12 tipos de tumores mostrou que os tumores da classe C (com alterações no número de cópias como característica predominante), que inclui a maioria dos carcinomas de mama, apresenta mutações no gene *TP53* e se subclassificam principalmente por alterações de perda ou ganho no cromossomo 8 (Ciriello et al., 2013). De fato, o conhecimento atual do processo

---

carcinogênico indica que a sinalização oncogênica, promovendo a desregulação do ciclo celular, crescimento e diferenciação bem como a instabilidade genômica, estão fortemente relacionados. Alteração em genes da via de reparo a danos do DNA, como o *TP53*, pode levar a instabilidade genômica (Orr & Compton, 2013). Nos tumores de mama, mutação em *TP53* e ganhos em 8q, principalmente com ampliações nos genes *MYC* e *YWHAZ* (mapeados em 8q24.21 e 8q22.3) foram também observados em uma parcela considerável dos tumores mamários (Ciriello et al., 2013). No nosso estudo também observamos ganhos nestas regiões contendo os genes *MYC* e *YWHAZ*. Amplificação do gene *YWHAZ*, que codifica uma proteína anti-apoptótica 14-3-3 $\zeta$ , já foi descrita por ter papel importante na quimiorresistência ao tratamento com antraciclinas e favorecer o desenvolvimento de metástase (Li et al., 2010).

Han et al. (2010) analisando as CNAs em carcinomas ductais linfonodo-positivos tratados com quimioterapia neoadjuvante com docetaxel (n=15) detectaram que no grupo de tumores que não responderam ao tratamento (n=7), os ganhos mais comuns estavam localizados em 8q (71%), sendo os mais frequentes em 8q24.3, 8q24.22, 8q24.21, 8q22.1, 8q22.2 e 8q22.3. Nos tumores resistentes ao tratamento, as regiões de perdas mais frequentes foram observadas também no cromossomo 8 (71%), no entanto elas envolviam o braço curto, sendo as mais comuns em 8p23.3, 8p23.2, 8p23.1, 8p21.3, 8p21.2. No presente estudo, as perdas em 8p23.3 foram associadas com características de pior prognóstico como: HER2+, grau III e Ki67 alto. Nossos achados sugerem que a perda dessa região genômica pode estar envolvida com características tumorais associadas com pior prognóstico. A associação entre a perda em 8p23.3 e resistência à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel não foi avaliada e poderia ser alvo de uma futura investigação. A maioria dos genes mapeados nas regiões de perdas de 8p23.3 não apresenta informações disponíveis em literatura, e portanto, não é possível até o momento

estabelecer uma associação dos achados do presente estudo com os genes mapeados nesta região.

Embora ganhos em 8q24.21 tenha sido associado com tumores de grau III, essa alteração foi significativamente associada com menor risco de acometimento de linfonodos, menor risco de desenvolvimento de metástase à distância e maior tempo de sobrevida livre de doença. Nesta região está mapeado o gene *CASC8* (*cancer susceptibility candidate 8*, nomeado anteriormente como *LOC727677*), que codifica um RNA não codificador. Estudos de GWAS (*genome wide association studies*) demonstraram que variantes polimórficas em *CASC8* estavam associadas com suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de alguns tumores. Tenesa et al. (2008), por meio de GWAS, relataram que um SNP localizado no íntron 6 do gene *CASC8* estava associado com risco elevado de desenvolvimento de câncer colorretal. Outros polimorfismos já descritos nesta região também foram associados ao risco aumentado de desenvolver câncer de próstata, além de aparecimento da doença em idade jovem (Amundadottir et al., 2006; Gudmundsson et al., 2007; Gudmundsson et al., 2009). Para o nosso conhecimento não há dados funcionais relacionados a este gene.

A perda em 14q11.1-q11.2 foi associada com características de pior prognóstico, como tumores de grau III e Ki-67 alto, bem como com maior risco de desenvolvimento de metástase e menor tempo de sobrevida livre de doença. Vinte e oito genes estão mapeados nesta região, alguns deles estão associados com características não relacionadas a tumores, por exemplo, o gene *OR4K5*, que pertence a uma família de genes associados aos receptores de olfato. Além disso, a maioria dos genes ainda não apresenta função conhecida incluindo dois membros da família de genes *POTE* (*prostate, ovary, testis and placenta expression*): *POTEG* (*POTE ankyrin domain family, member G*) e *POTEM* (*POTE ankyrin domain family, member M*), os quais estão mapeados nesta região. Trata-

---

se de uma família de genes recentemente descrita e constituída de 13 genes parálogos distribuídos em 8 cromossomos e divididos em 3 famílias principais (Bera et al., 2002). Os genes *POTE-2 $\alpha$* , *POTE-2 $\beta$* , *POTE-2 $\gamma$*  e *POTE-22* já foram descritos como diferencialmente expressos em vários tumores, incluindo carcinoma de mama (Bera et al., 2006). Porém, a função destes genes não é conhecida ainda, sendo que alguns membros já foram descritos como envolvidos na estrutura de citoesqueleto, apoptose, regulação epigenética e diferenciação celular. Recentemente, foi relatada a expressão proteica aumentada da porção C-terminal de vários parálogos de POTE, com maiores escores de expressão nos tumores metastáticos (Redfiled et al., 2013). Além disso, vários parálogos de POTE sofrem fusão com o cDNA de actina, produzindo proteínas de fusão POTE-actina. Foi relatado o aumento de expressão de POTE-2 $\alpha$ -actin na linhagem tumoral HeLa após tratamento com fatores pró-apoptóticos. A transfecção de POTE-2 $\alpha$ -actina nestas células induziu apoptose, sugerindo que esta proteína de fusão está envolvida no processo de morte celular (Liu et al., 2009). Pela ausência de informações referente à função dos genes *POTE14-alpha* e *POTE14-beta* mapeados nesta região de perdas genômicas, não é possível saber se estes genes teriam um papel no câncer de mama.

Para identificar perfis genômicos associados com diferentes características clínicas e histopatológicas do CM, foram avaliadas as alterações do número de cópias de acordo com status dos receptores ER, PR e HER2, acometimento linfonodal e desenvolvimento de metástases à distância. Esta abordagem tem sido descrita em literatura e revelado alterações recorrentes, como melhor descrito a seguir.

A comparação entre os casos ER+ (35 casos) e ER- (17 casos) revelou ganhos em 17q12 exclusivos dos tumores ER-. Esta alteração estava presente em mais de 40% dos casos. Chin et al. (2007) utilizaram aCGH para avaliar as alterações no número de cópias em 148 CM e relataram que tumores ER- apresentavam amplificação em 17q12. O gene

---

*PPP1R1B* (*protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B*) está mapeado nesta região e codifica um regulador de fosfatase e foi detectado como alterado no nosso estudo. Vangamundi et al. (2010) encontraram aumento de expressão do gene *PPP1R1B* em 36% dos carcinomas de mama primários (principalmente ductais) em relação ao tecido normal. Assim, ganhos do gene *PPP1R1B* pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da expressão do gene.

Hamel et al (2010) mostraram que a expressão aumentada de *PPP1R1B* estava associada à resistência ao tratamento com trastuzumab e pior prognóstico em carcinomas mamários. Utilizando ensaios *in vitro* com linhagens tumorais de mama, os autores mostraram que a expressão aumentada da forma truncada da proteína (t-Darpp) estava associada com ativação de Akt e resistência ao trastuzumab. Assim, os autores propuseram que a expressão da proteína *PPP1R1B* poderia ser utilizada como um marcador preditivo de resposta ao tratamento com trastuzumab. Além disso, sugeriram que o bloqueio desta proteína poderia ser utilizado em pacientes com tumores HER-2+ que recorrem durante ou após o tratamento com transtuzumab. Notavelmente, no presente estudo, verificou-se que dentre os casos ER- (N=17), 7 (41%) são HER+, sendo que 6 (85%) deles mostraram amplificação do gene *PPP1R1B*. Embora não tenha sido possível avaliar a resposta à terapia com trastuzumab nestas pacientes, estudos futuros podem ser delineados no sentido de avaliar se esta alteração genômica, levando eventualmente ao aumento de expressão de *PPP1R1B*, poderia interferir na resposta ao tratamento das pacientes ER-HER2+.

Interessantemente, em literatura, a amplificação do gene *PPP1R1B* foi relatada em tumores Luminais A (ER+/HER2-), ao contrário do nosso estudo em que foi observada essa alteração em amostras ER-/HER2+. Este estudo em carcinomas de mama foi desenvolvido pelo *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Initiative* e incluiu análises genômicas, transcriptômicas, epigenômicas e proteicas em um grande número de amostras

---

(ao redor de 500 casos) (*The Cancer Genome Atlas Network*, 2012). Os resultados conflitantes podem ser explicados por diferenças genéticas nas populações avaliadas. Entretanto, o número de casos aqui avaliados e que apresentaram essa alteração ainda é limitado para conclusões.

No presente estudo, a comparação entre tumores PR- (n=28) e PR+ (n=24) revelou alterações em 27 regiões genômicas (cinco ganhos e 22 perdas) exclusivas dos tumores PR-, sendo perdas em 8p21.3 e em 14q11 as alterações com maior prevalência nestes casos (~29%).

Em 8p21.3 estão mapeados 13 genes (*POLR3D*, *PIWIL2*, *SLC39A14*, *PPP3CC*, *AKI25860*, *SORBS3*, *PDLIM2*, *FLJ00072*, *C8orf58*, *KIAA1967*, *FLJ14107*, *BIN3*, *EGR3*). Destes, o *PDLIM2* [*PDZ and LIM domain 2 (mystique)*], também conhecido como *SLIM* e *Mystique*] codifica uma proteína que suprime o crescimento dependente de ancoragem e promove adesão e migração celular por meio de interações com actina do citoesqueleto, sendo portanto, considerado um potencial supressor tumoral. A diminuição de expressão gênica e proteica de *PDLIM2* já foi descrita em linhagens tumorais de mama comparadas com linhagem epitelial normal de mama (Qu et al., 2010). No mesmo estudo, a reexpressão de *PDLIM2* na linhagem MDA-MB231 reprimiu a ativação de NK-kB e os genes por ele ativados, como Bcl2 e ciclina D1. Além disso, modelo de xenotransplante com as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 que expressavam *PDLIM2* demonstrou que embora todos os animais tenham desenvolvido tumores, esses tumores eram menores que aqueles dos animais do grupo controle. Os autores também mostraram por ensaio *in vitro* com agentes desmetilantes, que a repressão do *PDLIM2* é mediada por metilação (Qu et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que o tratamento da linhagem tumoral MCF-7 com a forma ativa da vitamina D [1,25(OH)2D3] promove a desmetilação do gene *PDLIM2* e diminuição da migração, adesão e invasão celular (Vanoirbeek et al., 2013). É possível que

---

além de metilação, perda do gene *PDLIM2* possa ser um mecanismo de desregulação deste gene num subconjunto de casos de tumores de mama.

Thomassen et al. (2009) avaliaram a relação entre os níveis de expressão gênica e o mapeamento dos genes diferencialmente expressos identificados no estudo. Os autores realizaram uma meta-análise incluindo mais de 1200 carcinomas de mama para identificar regiões cromossômicas e genes candidatos possivelmente causais do processo metastático. Utilizando análises de enriquecimento de genes, os autores relataram que genes mapeados em 1q41–42, 8q24, 12q14, 16q22, 16q24, 17q12–21.2, 17q21–23, 17q25, 20q11 e 20q13 apresentavam aumento de expressão entre os tumores metastáticos e genes mapeados em 1p31–21, 8p22–21 e 14q24 apresentavam diminuição de expressão. Os candidatos a supressores de metástases estariam mapeados em 1p31 (*DIRAS3*) em 8p21-22 (*PSD3*, *LPL*, *EPHX2*) em 14q24 (*FOS*). Os potenciais promotores de metástase estariam mapeados em 8q24 (*RECQL4*), 16q22 (*PRMT7*), 16q24 (*GINS2*) e 20q13 (*AURKA*). Em nosso estudo, a perda em 8p21-22, contendo principalmente os genes *PSD3* (*pleckstrin and Sec7 domain containing 3*) e *LPL* (*lipoprotein lipase*), foi observada em 25% dos casos de tumores PR-. A diminuição da expressão do gene *PSD3/EFA6R* foi relatada em carcinoma de ovário de alto grau quando comparado a tecidos normais ou de baixo grau (Pils et al., 2005). Os autores descreveram esse gene como candidato a supressor tumoral, uma vez que sua expressão foi significativamente menor em tumores de grau mais elevado e, muitas vezes, foi completamente perdida em linhagens celulares de câncer de ovário. Perdas na região onde os genes *PSD3* e *LPL* estão mapeados foram detectadas em sete casos PR-, sendo que todos eles apresentavam alto grau (GIII) e dois deles tinham acometimento de linfonodos, porém nenhum desenvolveu metástase durante o seguimento clínico.

A análise das alterações genômicas de acordo com o status de HER2 (42 tumores HER- e 7 HER+) revelou alterações envolvendo ganhos e perdas exclusivas nos tumores

---



HER2+. Mais de 50% das alterações se localizaram em 15q, prevalecendo as perdas genômicas. Por outro lado, também foram detectados ganhos envolvendo o cromossomo 17.

Perdas em 15q22.2, onde está mapeado o gene *RORA* (*retinoid orphan nuclear receptor alpha*), foram detectadas em ~43% dos tumores HER2+. Estudo recente demonstrou diminuição de expressão gênica e proteica de RORA em linhagens e tecidos tumorais de mama (Xiong et al., 2012). A indução de expressão de RORA diminuiu a capacidade de invasão das linhagens tumorais T4-2 e MDA-MB 231 *in vitro* e *in vivo*. Além disso, níveis diminuídos de transcritos de *RORA* e *SEMA3F* (*semaphorin 3F*), um supressor tumoral ativado por *RORA*, foram associados com pior prognóstico em tumores de mama (Xiong et al., 2012). A perda do gene supressor *RORA* em quase metade dos casos HER2+ poderia explicar, pelo menos em parte, a característica mais agressiva destes tumores.

Perdas em 15q14-q15.1 foram detectadas em aproximadamente 30% dos casos. Nesta região estão mapeados nove genes, sendo que perdas em seis deles (*C15orf54*, *EIF2AK4*, *FSIP1*, *GPR176*, *SRP14* e *THBS1*) já foram observadas nos tumores de mama subtipo HER, confirmando nossos achados (The Cancer Genome Atlas, 2012). Dentre estes genes, o gene *THBS1* (*thrombospondin 1*) tem função de supressor tumoral por inibir a angiogênese. A expressão da proteína THBS1 já foi relatada em tumores de mama e associada com características de bom prognóstico (Ioachim et al., 2012). Perda deste gene nos tumores HER2+ poderia promover maior agressividade destes tumores por favorecer a angiogênese.

Alterações no cromossomo 17 têm sido relatadas nos carcinomas de mama, principalmente a amplificação da região 17q12-q21. Em 17q12 está mapeado o oncogene *HER2/ERBB2*, uma alteração bem caracterizada em carcinomas de mama, entretanto,

---

outros genes podem estar coamplificados e tendo um papel relevante na carcinogênese mamária. De fato, relatos em literatura sugerem que amplificação do gene *HER2* leva à instabilidade nesta região genômica, indicando que a amplificação de *HER2* é o “*driver*” para os amplicons detectados nesta região (Ellsworth et al., 2008; Lamy et al, 2011). Os genes coamplificados e coativados podem ter um papel importante na progressão da doença e na resposta clínica, representando então, importantes alvos de pesquisas (Kauraniemi & Kallioniemi, 2006).

Genes já descritos como coamplificados nos tumores com amplificação de *ERBB2*, como *GRB7*, *STARD3* mapeados em 17q12 (Mahmoud et al., 2013); bem como *TOP2A*, *IGFBP4* e *RARA* mapeados em 17q21.2 (Kauraniemi & Kallioniemi, 2006; Jacot et al, 2013), foram também detectados com aumento do número de cópias no nosso estudo. Além disso, a amplificação do gene *PPP1R1B*, mapeado em 17q12 também foi observada nos tumores com amplificação de *HER2*, como descrito em detalhes acima.

Ganhos em 17q12 contendo os genes *RARA* (*retinoic acid receptor a*) e *KRT20* (*cytokeratin 20 gene*) foram detectados em 29% e 26% dos casos *HER2+*, respectivamente. A amplificação dos genes *RARA* e *KRT20* já foi associada com tumores linfonodos positivos (Lamy et al, 2011). Corroborando com os dados descritos em literatura, os autores concluíram que a amplificação de *HER2* possivelmente orienta a instabilidade genômica em 17q, resultando em diferentes padrões de ampliações gênicas. Além disso, os dados sugeriram que as ampliações presentes em regiões distais de 17q devem conferir um caráter mais agressivo aos tumores quando comparados às ampliações restritas à região do gene *HER2*. No presente estudo, dois casos mostraram alto nível de ganhos na região contendo os genes *RARA* e *KRT20*, sendo que um caso apresentava acometimento de linfonodos, corroborando com os dados da literatura.

---

---

Staaf et al (2011) avaliaram o perfil de alterações cromossômicas por aCGH e SNP-array em tumores de mama (n=244) e linhagens tumorais (n=16) com amplificação do gene *HER2/ERBB2* comparados com tumores sem a amplificação (n=346). Os autores relataram 36 regiões principais afetadas por ganhos ou perdas genômicas envolvendo os cromossomos 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20 e 22. Em comum com o nosso estudo foram detectados ganhos em 17q11.2, 17q12 e 19q12 e perdas em 12q24.33 e 15q22.1. Além disso, demonstraram que um subgrupo de tumores apresentava poucas CNAs associadas com menor frequência de número de cópias neutras (CNN-AI: *copy number neutral- allelic imbalance*) e ploidia, indicando que estes tumores tinham menor complexidade, e essa característica não era restrita dos tumores do subtipo HER. Por outro lado, as amplificações detectadas eram em geral monoalélicas nos tumores com amplificação de *HER2*. Assim, os autores reforçaram os dados da literatura que indicam que os carcinomas de mama HER2+, que aparecem numa frequência em torno de 20% dos tumores de mama, são na verdade um grupo heterogêneo de tumores, tanto em nível molecular quanto no comportamento clínico. Desta forma, é necessária uma melhor compreensão destes tumores, principalmente para melhoria do tratamento dessas pacientes. Embora ainda controverso, parece que essas diferenças se devem à positividade de ER nesses tumores, que parece ocorrer em torno de 50% dos casos HER2+ (Vaz-Luis et al., 2013). No nosso estudo, foram avaliados apenas sete tumores HER2+ comparados com tumores HER2-, assim estudos posteriores com maior número de casos devem ser desenvolvidos para permitir a estratificação pelo status de ER e a melhor caracterização das alterações de tumores de pacientes brasileiras com amplificação do gene *HER2/ERBB2*.

Os tumores de mama triplo-negativos (ER-, PGR- e HER2-) apresentam um comportamento agressivo e não há uma terapia alvo-específica sendo, portanto, um desafio

---

para pesquisa translacional dos CM. Frequentemente apresentam-se como tumores de alto grau e com alta taxa de mutação no gene *TP53* e em *BRCA1*. Os tumores triplo negativos (TN) compreendem entre 10-15% dos casos de CM, sendo que sua incidência varia de acordo com a população estudada. Há relatos de maior incidência destes tumores em mulheres negras (africanas ou afro-americanas) e em hispânicas comparadas às mulheres brancas, geralmente ocorrendo em mulheres mais jovens (antes da menopausa). Essas diferenças entre grupos raciais sugere a existência de genes ou mutações que predis põem mulheres negras ou hispânicas ao desenvolvimento destes tumores (Boyle, 2012, Stevens et al., 2013).

Assim, considerando a alta taxa de miscigenação da nossa população, o estudo de tumores TN de pacientes brasileiras deve contribuir para a melhor compreensão das vias moleculares envolvidas neste grupo particular de tumores. Sendo assim, foram comparados os perfis de alterações genômicas detectados nos tumores TN (n=10) em relação aos tumores com pelo menos um dos três receptores positivo (n=43). As análises mostraram ganhos genômicos em 2p22.1 e 12p13.2 exclusivas dos tumores TN e presente em 30% dos casos.

Ganhos em 2p22.1 envolveram os genes *ARL6IP2/ATL2*, *CR624999*, *DKFZp6671103* e *HNRPLL*. Destes genes apenas dois tem função conhecida, porém sem nenhuma associação descrita com câncer até o momento. O gene *ARL6IP2* (*atlastin GTPase 2*) codifica uma proteína envolvida no processo de geração dos túbulos do retículo endoplasmático. O gene *HNRPLL* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like*) codifica uma proteína envolvida no processamento de RNA mensageiro de células plasmáticas. É possível que essas alterações sejam *passengers*, muito comumente detectadas nos tumores como resultado da instabilidade genômica.

---

Ganhos em 12p13.2, onde estão mapeados os genes *ETV6*, *BCL2L14* e *LRP6*, também foram detectados em 33% dos TN. Em particular, o gene *LRP6* (*low density lipoprotein receptor-related protein 6*) codifica um membro da família do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e mostrou-se com aumento no número de cópias genômicas em 30% dos tumores TN. Os receptores de LDL são proteínas de superfície celular transmembranares envolvidas na endocitose mediada pelo receptor da lipoproteína e ligantes. A proteína *LRP6* juntamente com *LPR5* e *Frizzled (FZD)* (um receptor de transmembrana) ligam-se à proteína *Wnt*, ativando a via canônica de *Wnt/β-catenina*. A via *Wnt/β-catenina* tem papel importante na regulação da diferenciação celular, proliferação e migração e está envolvida com o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma de mama. Nos tecidos mamários, a via *Wnt* tem papel importante na autorrenovação de células tronco e no desenvolvimento das glândulas mamárias. A ativação aberrante da via *Wnt/β-catenina* parece estar envolvida na carcinogênese mamária (revisado em King et al., 2012). Já foi demonstrado o acúmulo nuclear e citosólico de  $\beta$ -catenina, um indicador da ativação de via *Wnt* particularmente nos tumores de mama TN, diferentemente do observado nos tumores de outros subtipos. Além disso, esse acúmulo de  $\beta$ -catenina foi também associado com pior prognóstico dos tumores TN (Khramtsov et al., 2010; revisado em King et al, 2012). Em outro estudo avaliando 245 tumores de mama foi relatada a expressão proteica aberrante de  $\beta$ -catenina em carcinomas lobulares e em tumores não lobulares de grau III. Os autores descreveram ainda uma associação significativa entre a expressão aberrante de  $\beta$ -catenina e tumores de mama TN e com fenótipo *basal-like*, sugerindo que a via *Wnt/β-catenina* está preferencialmente ativada nestes tumores. Não é conhecido o exato mecanismo de ativação desta via neste grupo particular de tumores, uma vez que são raramente descritas em CM as mutações em genes da via como *APC* (*Adenomatous polyposis coli*), *CTNNB1* (*catenin - cadherin-associated*

---

---

*protein beta 1*) e *AXINI*. Assim, Geyer et al. (2011) sugerem que a ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina é uma consequência da ativação do programa de transição epitélio-mesênquima, que é característico dos tumores *basal-like*.

Há relatos que outros componentes da via Wnt/ $\beta$ -catenina estão alterados nos CM, como aumento de expressão dos receptores LRP5 e LRP6 (revisado em King et al., 2012). De particular interesse, o aumento de expressão dos transcritos de *LRP6* foi descrito em tumores *basal-like*/TN (Lindvall et al., 2009), porém não são conhecidos os mecanismos envolvidos na desregulação deste gene. Assim, é possível que o aumento do número de cópias do gene *LRP6*, como observado aqui nos tumores TN, leve ao aumento de expressão da proteína e ativação da via Wnt. Liu et al. (2010) detectaram aumento de expressão dos transcritos e da proteína LRP6, mas não de LRP5, em tumores de mama, particularmente nos tumores ER-, HER2- e estadio III. Os autores avaliaram também linhagens tumorais de mama e detectaram aumento de expressão proteica nas linhagens triplo-negativas MDA-MB-231 e HCC1187. O silenciamento do gene *LRP6* nestas linhagens diminuiu significativamente a sinalização da via Wnt/ $\beta$ -catenina, bem como promoveu a diminuição da proliferação. Além disso, a expressão aumentada de LRP6 na linhagem tumoral T-47D, que expressa baixos níveis endógenos de *LRP6*, promove aumento da sinalização de Wnt e aumento da proliferação nestas células, demonstrando a importância de LRP6 no controle da via Wnt/ $\beta$ -catenina. Para avaliar a importância de LRP6 no modelo *in vivo* de carcinogênese mamária, os autores utilizaram xenotransplantes das linhagens MDA-MB-231 *wild-type* e *knockout* para *LPR6*. Os autores relataram a diminuição da via Wnt/ $\beta$ -catenina e do crescimento do tumor nos animais transplantados com a linhagem *knockout* para *LPR6*, sugerindo que *LRP6* pode ser um alvo interessante para terapia nestes tumores (Liu et al., 2010). Assim, a continuidade do nosso estudo em número maior de casos e utilizando outras estratégias metodológicas poderá confirmar se o

---

aumento de número de cópias de *LPR6* é um dos mecanismos associados com aumento dos seus níveis de expressão nos tumores TN.

Outro gene interessante mapeado na região de ganho em 12p13.2 detectado exclusivamente no grupo de TN é o gene *ETV6* (*ets variant 6*), que codifica um fator de transcrição da família ETS. Ganho no número de cópias genômicas deste gene foi detectado em 40% dos casos TN assim como em diversos outros tumores incluindo sarcomas, síndromes mielodisplásicas e leucemias. O gene *ETV6* gene tem sido relatado como envolvido em translocações com vários genes como *ABL1*, *FGFR3*, *SYK*, *JAK2*, além de *NTRK3*. Vários mecanismos podem induzir a ativação de proto-oncogenes, incluindo a translocação cromossômica. Algumas translocações podem ativar oncogenes e, quando recorrentes, podem servir de biomarcadores diagnósticos ou alvos terapêuticos. O carcinoma secretório da mama é relativamente raro onde tem sido descrito a presença da  $t(12;15)(p13;q25)$  resultando no gene de fusão *ETV6-NTRK3* que codifica uma proteína quinase quimérica (Tognon et al., 2001). A proteína quimérica tem atividade potente de transformação de fibroblastos e do epitélio ductal da mama por meio da ativação das vias PI3K-Akt e Ras-Mek1 (Tognon et al., 2001; Vasudev e Onuma, 2011). Interessantemente, a maioria dos carcinomas secretórios de mama são triplo-negativos e muitos deles tem perfil *basal-like* (Vasudev e Onuma, 2011).

Ganhos envolvendo o gene *ETV6* também foi detectado em tumores *basal-like* em um estudo recentemente publicado confirmando os achados do nosso estudo (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Ganhos em 12p associados com tumores *basal-like* já haviam sido relatados num estudo prévio com cerca de 2000 tumores de mama (Curtis et al., 2012).

Há relatos sugerindo que *ETV6* é um repressor transcricional e que regula diversos genes, no entanto, não é conhecido ainda o papel deste fator de transcrição tanto na sua

---

forma nativa quanto na forma oncogênica como proteínas de fusão (Hollenhorst et al., 2011). Um estudo em andamento do nosso grupo avaliará o número de cópias do gene *ETV6* por meio de FISH em um grande grupo de tumores mamários, com pelo menos 100 casos de tumores TN para confirmar o seu envolvimento nestes tumores.

Ganhos no número de cópias genômicas em 2p22.1 foram detectados em mais de 30% dos casos TN deste estudo. Nesta região estão mapeados os genes *ARL6IP2/ATL2*, *CR624999*, *DKFZp6671103* e *HNRPLL*. No entanto, não há informações disponíveis para maioria deles. O gene *CR624999* codifica um *long non-coding RNA*, porém sem função conhecida até o momento.

O comprometimento linfonodal (LN) é o fator prognóstico mais importante no CM e tem se mostrado repetidamente como o indicador mais importante de sobrevida livre da doença e sobrevida global (Buitrago et al., 2011). Assim, buscando identificar alterações genômicas associadas com o acometimento de linfonodos, foram comparados os perfis de alteração entre os grupos LN+ (35 casos) e LN- (n=18). Ganhos envolvendo 1q foram detectados exclusivamente no grupo LN+ e em mais que 25% dos casos. Particularmente, ganhos em 1q44 foram detectados em 27% dos casos LN+. Nesta região está mapeado o gene *SMYD3* (*SET and MYND domain containing 3*) que codifica uma histona metiltransferase, que desempenha um papel importante no controle da transcrição. Em 2004, Hamamoto et al. descreveram o aumento de expressão de *SMYD3* em hepatocarcinomas e no carcinoma colorretal e sua atividade de metiltransferase específica de histona H3 lisina-4, sugerindo que este gene poderia ter um papel importante na carcinogênese humana. Em 2006, o mesmo grupo mostrou que a expressão gênica e proteica de *SMYD3* também está aumentada em 50% dos carcinomas de mama avaliados. Além disso, o silenciamento do gene em linhagens tumorais de mama promoveu a diminuição da proliferação celular, indicando que este gene deve ter um papel importante

---



na carcinogênese mamária (Hamamoto et al., 2006). Um outro estudo subsequente revelou que a linhagem MDA-MB-231 de célula epitelial mamária normal quando transfectada com *SMYD3* apresentava características de célula transformada, com aumento da proliferação celular e crescimento de colônias em *soft agar* (Ren et al., 2011). Mais recentemente foi demonstrada a associação deste gene com progressão tumoral por Cock-Rada et al. (2012), que utilizaram um modelo de indução de tumor por infecção com o parasita intracelular *Theileria*. Os autores mostraram que a infecção levava à alteração epigenética do promotor do gene *MMP9* (*metaloproteinase 9*), por meio da indução de *SMYD3*, aumentando a capacidade de invasão das células infectadas. As metaloproteinases são importantes no processo de degradação da matriz extracelular, favorecendo o processo de invasão e metástase. Por meio de ensaios de transfecção e de silenciamento em linhagens tumorais humanas, os autores mostraram que *SMYD3* regula a transcrição de *MMP9*. Adicionalmente, um modelo *in vivo* de xenotransplante em *zebrafish* confirmaram que *SMYD3* e *MMP9* são importantes para a disseminação e metástase das células tumorais. Assim, é possível que ganho de número de cópias do gene *SMYD3* detectado aqui em 27% dos casos LN+ favoreça a disseminação das células tumorais, por contribuir para a invasão e metástase. Outros estudos são necessários para confirmar este achado e sua associação com progressão da doença.

Com intuito de identificar um perfil de alterações associadas com o fenótipo metastático dos tumores de mama foram comparadas as alterações genômicas dos casos que evoluíram para metástase (MD+, N=11) com os casos com boa evolução clínica (MD-, N=42). Interessantemente, alterações genômicas exclusivas foram detectadas apenas no cromossomo 8 e somente no grupo de tumores MD-, sendo que uma região de perda foi detectada em 8p e 26 regiões de ganho foram detectadas em 8q.

---

Em nosso estudo, 33% das pacientes que não desenvolveram metástase durante o seguimento clínico apresentaram ganhos envolvendo 8q21.13-q22.2, onde está mapeado o gene *TP53INP1* (*tumor protein p53 inducible nuclear protein 1*). *TP53INP1* impede a proliferação celular e medeia a apoptose induzida pela proteína p53 (Tomasini et al., 2003). Ito et al. (2006) mostraram que os níveis proteicos detectados por IHQ em carcinomas de mama (N=81) eram inversamente correlacionados com o tamanho tumoral, invasão linfonodal, grau histológico e expressão alterada da proteína p53. Estes resultados sugeriram que a ausência da proteína *TP53INP1* está associada com a progressão do carcinoma de mama. Assim, é possível que ganhos na região onde está mapeado o gene *TP53INP1* possam conferir proteção aos tumores quanto ao desenvolvimento de metástase. Investigações futuras, incluindo número maior de casos, devem ser conduzidas para confirmação deste achado.

Interessantemente, 8/26 regiões de ganhos em 8q foram também identificadas como exclusivas dos casos com doença localmente avançada, porém sem desenvolvimento de metástase (LN+/MD-). Estudo recente relatou que mesmo entre o grupo de pacientes com mais que 10 linfonodos positivos (pN3, segundo TNM revisado in 2003 pelo *American Joint Committee on Cancer*) observa-se um comportamento clínico heterogêneo, com probabilidade estimada de sobrevida livre de doença e sobrevida global em cinco anos de 46,7% e 69,8%, respectivamente (Koca et al., 2013). Assim, a detecção de vias alteradas diferenciais nos tumores LN+ com e sem desenvolvimento de metástase poderá contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo metastático do câncer de mama, e em última instância, numa melhor conduta clínica destas pacientes.

Ganhos em 8q22.2, onde estão mapeados os genes *STK3*, *OSR2* e *VPS13B*, foram detectados em 33% dos casos LN+/MD-. O gene *STK3* (*serine/threonine kinase 3*, também conhecido como *KRS1* e *MST2*) é ativado por moléculas pró-apoptóticas, principalmente

---

caspsases, que clivam as MST quinases, liberando o domínio quinase ativo que transloca para o núcleo e fosforila a histona 2B, levando à fragmentação do DNA. MST2 juntamente com MST1 (homólogos de *Hippo* em *Drosophila*) são componentes da via Hippo, que está associada com a promoção da diferenciação celular e apoptose e consequente inibição da proliferação celular. A via Hippo é uma cascata de sinalização supressora de tumor altamente conservada presente desde levedura até a espécie humana e está desregulada em vários tipos de câncer. Além disso, esta via está ligada a outras vias importantes relacionadas com câncer, como a via Wnt e de TGF- $\beta$  (Zhao & Guan KL, 2010; Yu & Guan, 2013). Por meio de análises de RNAseq e estudos funcionais, seguido de validação, Chen et al (2012) descreveram *LIFR* (*leukemia inhibitory factor receptor*) como um gene supressor de metástase em carcinoma de mama e que está associado com a ativação da via Hippo-Yap. Os autores mostraram que a expressão de LIFR está diminuída em carcinomas de mama, e que sua expressão está inversamente correlacionada com o desenvolvimento de metástase. Analisando 952 pacientes, os autores mostraram que a positividade de LIFR nos tumores de mama estava associada com maior sobrevida livre de recorrência e sobrevida global. Os autores mostraram que LIFR é um receptor de membrana que ativa a sinalização da via Hippo, por meio da ativação da cascata MST-LATS, que leva à fosforilação e inativação de YAP (*YES-associated protein*). YAP é um coativador transcricional que já foi associado com múltiplos processos ligados à progressão e metástase, incluindo proliferação, transformação, migração e invasão em melanoma e carcinoma de mama (Lamar et al., 2012). Sendo assim, nossa hipótese é que o aumento no número de cópias do gene *STK3* (detectado em 33% dos tumores LN+/MD- ) leve ao aumento de sua expressão, favorecendo a sinalização da via Hippo, e com isso diminuindo a capacidade metastática em um subconjunto destes tumores. É possível também que

---

---

ganhos no gene *STK3* possam contribuir para a alteração de outras vias conectadas com a via Hippo, como a via Wnt e TGF- $\beta$ .

Foi realizada a análise de agrupamento hierárquico não supervisionado sendo identificados perfis de alterações cromossômicas distintas que separavam os tumores de mama em dois grupos: *cluster 1* (22 casos) e *cluster 2* (31 casos). Interessantemente, o *cluster 1* associou-se significativamente com tumores com características de bom prognóstico (graus I-II, Ki-67- /baixo e ER+), comparados aos demais. Rennstam et al. (2003) utilizando CGH cromossômico em 305 CM de pacientes da Suécia e Finlândia identificaram três grupos de tumores segundo as alterações no número de cópias, sendo que o grupo A correlacionou-se com positividade para ER/PR; grupos B e C com alto grau histológico e acometimento de linfonodos; grupo B com alta taxa proliferativa e maior tamanho tumoral e PR-. Destes, foi observada sobrevida diminuída nos casos do grupo C, cujas principais alterações detectadas eram perdas em 8p e ganhos em 8q. Recentemente, Curtis et al. (2012) utilizando análise integrada de dados genômicos e transcriptômicos de 997 tumores de mama identificaram 10 clusters, que foram validados num grupo independente de tumores (N=995). Dentre os clusters identificados, o cluster 2 contendo um subgrupo de tumores ER+ apresentou pior sobrevida, cuja característica era uma frequência maior de amplificação de um grupo de genes, incluindo *CCND1* mapeado em 11q13.3. O conjunto de resultados deste estudo mostrou agrupamentos mesmo dentre os subtipos conhecidos de CM baseados apenas nos perfis de expressão gênica, comprovando a heterogeneidade destes tumores.

No nosso estudo, 47 alterações envolvidas em ganhos genômicos estavam mapeados numa região de cerca de 2 Mb em 8p11.21-q24.3. Esta alteração foi detectada em mais de 50% dos casos pertencentes ao *cluster 2*. Nesta região está mapeado o gene *ASAP1* (*ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1*) que está envolvido

---

no tráfego de membrana e remodelamento de citoesqueleto. *ASAPI* já foi relatado em outros estudos relacionando-o à invasão tumoral. Onodera et al (2005) demonstraram, em CM, que o silenciamento de *ASAPI* diminui a capacidade de invasão em modelo *in vitro*. Além disso, níveis mais altos da proteína ASAP1 foram detectados nos carcinomas invasivos em comparação com carcinomas ductais *in situ* em amostras pareadas das mesmas pacientes. Estes dados sugerem que *ASAPI* participa e desempenha um papel fundamental no potencial de malignidade dos tumores de mama. Lin et al. (2013) demonstraram, em cultura de células de câncer de próstata humana, que a redução da expressão da proteína ASAP1 diminuiu a migração e a invasão. Os autores relataram também que a proteína, bem como o mRNA, apresentaram expressão significativamente maior no tumor de próstata metastático se comparado ao não metastático ou ao tecido prostático benigno, todos derivados do mesmo paciente. Além disso, mostraram que há uma forte correlação entre metástase e o aumento dos níveis proteína ASAP1 no câncer de próstata. Assim, é possível que ganhos do número de cópias do gene *ASAPI* (presente em pelo menos 50% dos tumores do cluster 2) esteja associado com pior prognóstico. Análise detalhada desta região em um número maior de casos poderá esclarecer se este gene está associado com tumores mamários com potencial mais invasivo.

Ganhos em 8q24.11 onde estão mapeados os genes *EIF3H* (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H*) e *RAD21* [*RAD21 homolog (S. pombe)*] foram detectados em mais que 50% dos casos do cluster 2. Estes genes foram recentemente identificados como *drivers* contido no amplicon detectado nessa região em carcinomas de mama (Mahmood et al, 2013). Os autores utilizaram linhagens tumorais de mama para *screening* por silenciamento de RNA (siRNA) de 101 genes candidatos a *drivers*. Estes genes candidatos já haviam sido relatados como apresentando expressão aumentada em tumores de mama e pertencentes a 8 amplicons mapeados em 8q e 17q. Oito genes candidatos foram

---

identificados numa primeira etapa, sendo que seis deles: *ERBB2* e *GRB7* (ambos em 7q12); *RAD21* e *EIF3H* (ambos mapeados em 8q23), *CHRAC1* (8q24.3) e *TANC2* (17q23) foram identificados como potenciais genes *drivers*. O silenciamento da expressão de quatro genes (*EIF3H*, *RAD21*, *CHRAC1* e *TANC2*) nas linhagens MCF7 e HCC1937 diminuiu a viabilidade celular, promoveu parada do ciclo celular, induziu apoptose e inibiu a formação de colônias independente de ancoragem. Além disso, especificamente os genes *RAD21* e *EIF3H* também foram identificados como marcadores prognósticos nos carcinomas mamários, onde o aumento de expressão destes genes associou-se com a diminuição do tempo de sobrevida livre de recorrência. No presente estudo, possivelmente pelo número limitado de amostras, não foi observada diferença na sobrevida livre da doença e sobrevida câncer-específica na presença desta alteração, embora presente em 50% dos casos. Estudo em maior número de casos com bom seguimento clínico poderá revelar se ganhos nestes genes estão associados com prognóstico nos CM de pacientes brasileiras.

O gene *RAD21* codifica uma proteína envolvida no reparo a danos da dupla-fita de DNA e na coesão da cromátide durante a mitose. Xu et al. (2011) demonstraram que o aumento dos transcritos de *RAD21* estava associado com a amplificação do gene detectada em 32% (7/22) de tumores luminais, 31% (4/13) de *basal-like* e 22% (2/9) de HER2+, especificamente nos tumores grau III. Além disso, a expressão proteica de *RAD21* foi associada com recorrência precoce e com diminuição de sobrevida global em pacientes tratados com quimioterapia. O silenciamento de *RAD21* na linhagem de mama MDA-MB-231 aumentou a sensibilidade ao tratamento quimioterápico, sugerindo que a expressão de *RAD21* está associada com pior prognóstico e resistência à quimioterapia em tumores grau III.

Ganhos em 8q24.12, onde estão mapeados os genes *TAF2*, *DSCC1* e *DEPDC6/DEPTOR*, foram detectados em 58% dos tumores do *cluster 2*. Curiosamente, o

---

gene *DEPTOR* (*DEP domain containing mTOR-interacting protein*) codifica um inibidor endógeno de mTOR, uma via de sinalização importante no processo carcinogênico pertencente à subfamília das proteínas quinases relacionadas a PI3K, regulando inúmeros processos celulares, incluindo crescimento celular, apoptose e metabolismo. Embora *DEPTOR* seja um inibidor de mTOR, seu aumento de expressão promove ativação da sinalização de Akt, um componente da via de mTOR, por um mecanismo de loop feedback-negativo (revisado em Wang et al, 2012).

Por se tratar de um inibidor da via mTOR, *DEPTOR* pode ser considerado um supressor tumoral. No entanto, o seu papel no processo tumoral é controverso. *DEPTOR* pode ser considerado um supressor tumoral ou um oncogene dependendo do contexto e do tecido. Há relatos de diminuição e aumento de expressão de *DEPTOR* em diferentes tumores (revisado em Wang et al, 2012). Aumento de expressão já foi relatado em mieloma múltiplo (Peterson et al., 2009) e em carcinoma de tireoide (Pei et al., 2011). Foi avaliada a expressão proteica de *DEPTOR* em 114 carcinomas diferenciados de tireoide e foi verificado um aumento de expressão nos tumores comparado com tecido normal e tecido normal adjacente. Além disso, foi demonstrado que *DEPTOR* é um marcador prognóstico independente destes tumores, com aumento de expressão associada com recorrência precoce e diminuição da sobrevida (Pei et al., 2011). Há evidências do papel de *DEPTOR* no crescimento celular, apoptose, autofagia, transição epitélio-mesênquima e resistência à droga (revisado em Wang et al, 2012). Desta forma, o aumento no número de cópias da região contendo o gene *DEPTOR* detectado aqui nos tumores do cluster 2 poderia favorecer um fenótipo mais agressivo nos carcinomas de mama. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar estes achados e correlaciona-los com a evolução clínica das pacientes com CM.

---

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato do perfil de alterações genômicas pela metodologia de CGH array em carcinomas ductais invasivos de pacientes brasileiras. Por se tratar de um estudo de *screening*, o presente estudo revelou várias regiões alteradas, contendo genes candidatos, associados a diferentes características clínicas e histopatológicas. Alguns genes candidatos já foram selecionados para validação e confirmação dos achados, objeto de outro estudo em andamento. Certamente, este estudo deverá contribuir para compreensão das alterações moleculares envolvidas nos tumores mamárias da nossa população.

---





## 7 CONCLUSÕES

O perfil de alterações genômicas entre os 53 carcinomas ductais invasivos de mama revelou o envolvimento de 19 alterações cromossômicas recorrentes significativas sendo mais frequentes os ganhos em 8q24.21 (36%) e 1q44 (32%), assim como a perda em 8p11.23 (28%) .

Ganhos em 8q24.21 foi significativamente associado com menor risco de acometimento de linfonodos, menor risco de desenvolvimento de metástase à distância e maior tempo de sobrevida livre de doença. Nesta região está mapeado o gene *CASC8*, que codifica um RNA não codificador, e é um potencial candidato envolvido nestes processos por potencialmente regular vários genes.

A comparação entre os casos ER+ (35 casos) e ER- (17 casos) revelou ganhos em 17q12 (40% dos casos) exclusivos dos tumores ER-. Embora discordante da literatura, é possível que ganhos e consequente aumento de expressão do gene *PPP1R1B*, mapeado nesta região, seja um candidato a marcador nos tumores ER negativos de carcinomas mamários da população brasileira.

A perda em 8p21-22, contendo principalmente os genes *PSD3* e *LPL* foi observada em 25% dos casos de tumores PR negativos. O PSD3 é um candidato a supressor tumoral descrito em outros estudos.

Perdas em 15q e ganhos em 17q12-21 foram as mais prevalentes em carcinomas de mama HER2. A amplificação de *ERBB2*, *GRB7*, *STARD3* mapeados em 17q12 e de *TOP2A*, *IGFBP4* e *RARA* mapeados em 17q21.2 foram detectados no presente estudo e foram concordantes com os dados da literatura.

A comparação dos perfis de alterações genômicas nos tumores TN (n=10) com os tumores com pelo menos um dos três receptores positivo (n=43) revelou ganhos genômicos

---

em 2p22.1 e 12p13.2 (30% dos casos, para as duas alterações) exclusivas dos tumores TN. Os tumores triplo negativos também apresentaram alta frequência de ganhos em 12p13.2 onde estão mapeados os genes *ETV6*, *BCL2L14* e *LRP6*. O aumento de expressão dos transcritos de *LRP6* e *ETV6* foram descritos em tumores *basal-like*/TN porém os mecanismos envolvidos na desregulação destes genes não são conhecidos.

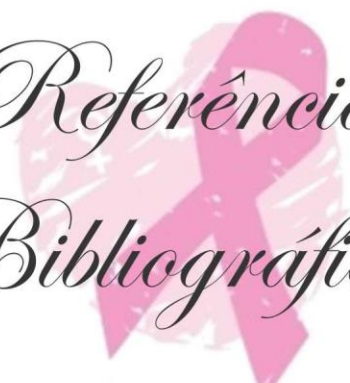
Ganhos em 1q44 foram detectados em 27% dos casos envolvendo o gene *SMYD3*, o qual codifica uma histona metiltransferase, que desempenha um papel importante no controle da transcrição. O aumento da transcrição deste gene foi relatada previamente em carcinomas de mama e relacionado com aumento da invasividade tumoral e metástase.

A comparação do perfil genômico dos casos que evoluíram para metástase à distância (MD+, N=11) com os casos com boa evolução clínica (MD-, N=42) revelou uma região de perda em 8p e 26 regiões de ganhos em 8q exclusivos dos casos MD negativos. Vários candidatos mapeados nessas regiões foram identificados, como o *TP53INP1*, e tem potencial para serem utilizados como marcadores de metástase a distância.

Ganhos em 8q22.2, onde estão mapeados os genes *STK3* foram identificados em 33% dos casos LN+/MD-. É possível que ganhos no gene *STK3* possam contribuir para a alteração de outras vias conectadas com a via Hippo, como a via Wnt e TGF- $\beta$  e contribuir para a invasão para linfonodos.

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado revelou dois *clusters*. O *cluster* 1 (22 casos) associou-se significativamente com características de bom prognóstico (Graus I-II, Ki-67- /baixo e ER+), comparados com o *cluster* 2 (31 casos). Ganhos em 8p11.21-q24.3 foi observado em 50% dos casos do *cluster* 2, onde se mapeia o gene *ASAP1* entre outros. Este gene é um candidato a marcador de pior prognóstico em carcinomas de mama. Os genes *RAD21* e *EIF3H* (mapeado em 8q23 e presentes em >50% dos casos do *cluster* 2) também foram identificados como marcadores prognósticos nos carcinomas mamários no nosso estudo e em outros da literatura.

---



*Referências  
Bibliográficas*

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminino. *Rev. Bras. Cancerologia*. 2002 48(1):113-131
- Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet*. 2003 Aug;34(4):369-76.
- Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nature genetics*. 2006;38(6):652-8.
- Arpino G, Weiss H, Lee VA, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer; association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1254e1261.
- Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. *Lancet*. 2009 Apr 25;373(9673):1463-79.
- Bera TK, Zimonjic DB, Popescu NC, Sathyanarayana BK, Kumar V, Lee B, et al. POTE, a highly homologous gene family located on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(26):16975-80.
- Bera TK, Saint Fleur A, Lee Y, Kydd A, Hahn Y, Popescu NC, et al. POTE paralogs are induced and differentially expressed in many cancers. *Cancer research*. 2006;66(1):52-6.
- Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Nov;45(11):1033-40.
- Bonnet F, Guedj M, Jones N, Sfar S, Brouste V, Elarouci N, et al. An array CGH based genomic instability index (G2I) is predictive of clinical outcome in breast cancer and reveals a subset of tumors without lymph node involvement but with poor prognosis. *BMC medical genomics*. 2012;5:54. Epub 2012/11/29.
- Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 6:vi7-12.
- Braun L, Mietzsch F, Seibold P, Schneeweiss A, Schirmacher P, Chang-Claude J, et al. Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic
-

- relevance of progesterone receptor loss. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013. Epub 2013/04/06.
- Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. *Com. Ciências Saúde*, v. 22 Sup 1, S69-S82p, 2011.
- Caldarella A, Buzzoni C, Crocetti E, Bianchi S, Vezzosi V, Apicella P, et al. Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2013;139(4):617-23. Epub 2012/12/28.
- Callagy G, Pharoah P, Chin SF, Sangan T, Daigo Y, Jackson L, et al. Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays. *J Pathol.* 2005 Feb;205(3):388-96.
- Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61-70.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Dec;7(12):683-92.
- Carracedo A, Salido M, Corominas JM, Rojo F, Ferreira BI, Suela J, et al. Are ER+PR+ and ER+PR- breast tumors genetically different? A CGH array study. *Cancer genetics.* 2012;205(4):138-46. Epub 2012/05/09.
- Cavalli LR, Urban CA, Dai D, de Assis S, Tavares DC, Rone JD, et al. Genetic and epigenetic alterations in sentinel lymph nodes metastatic lesions compared to their corresponding primary breast tumors. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2003;146(1):33-40.
- Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. The promise of microarrays in the management and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):100-4.
- Chao HH, He X, Parker JS, Zhao W, Perou CM. Micro-scale genomic DNA copy number aberrations as another means of mutagenesis in breast cancer. *PloS one.* 2012;7(12):e51719.
- Chen D, Sun Y, Wei Y, Zhang P, Rezaeian AH, Teruya-Feldstein J, et al. LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nature medicine.* 2012;18(10):1511-7.
-

- 
- Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, Lapuk A, Yamada K, Auersperg N, et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nature medicine*. 2004;10(11):1251-6.
- Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):529-41.
- Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, Wang Y, Barbosa-Morais NL, Thorne NP, et al. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol*. 2007;8(10):R215.
- Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature genetics*. 2013;45(10):1127-33.
- Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7316-39.
- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366(9503):2087-106.
- Cock-Rada, MA. et al., SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res*. 2012. 1; 72(3): p. 810–820.
- Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(7):924-31.
- Corben AD. Pathology of invasive breast disease. *The Surgical clinics of North America*. 2013;93(2):363-92.
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
- Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *British journal of cancer*. 2000;83(12):1688-95.
- Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*. 2005 Mar;51(3):494-503.
-

- 
- Ellsworth RE, Ellsworth DL, Patney HL, Deyarmin B, Love B, Hooke JA, et al. Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. *BMC cancer*. 2008;8:297.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10. Epub 1991/11/01.
- Faneyte IF, Peterse JL, Van Tinteren H, Pronk C, Bontenbal M, Beex LV, et al. Predicting early failure after adjuvant chemotherapy in high-risk breast cancer patients with extensive lymph node involvement. *Clin Cancer Res*. 2004 Jul 1;10(13):4457-63.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, acesso em 21/maio/2013.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(2):85-97. Epub 2006/01/19.
- Fortney K, Jurisica I. Integrative computational biology for cancer research. *Human genetics*. 2011;130(4):465-81. Epub 2011/06/22.
- Garcia Fernandez A, Chabrera C, Garcia Font M, Fraile M, Lain JM, Barco I, et al. Positive versus negative sentinel nodes in early breast cancer patients: Axillary or loco-regional relapse and survival. A study spanning 2000-2012. *Breast*. 2013. Epub 2013/05/21.
- Gebrim LH, Quadros, LGA. Rastreamento do câncer de mama no Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2006, vol.28, n.6, pp. 319-323.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1983;31(1):13-20.
- Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A, et al. beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(2):209-31.
- Goncalves R, Ma C, Luo J, Suman V, Ellis MJ. Use of neoadjuvant data to design adjuvant endocrine therapy trials for breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2012;9(4):223-9.
- Gravier E, Pierron G, Vincent-Salomon A, Gruel N, Raynal V, Savignoni A, et al. A prognostic DNA signature for T1T2 node-negative breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 Dec;49(12):1125-34.
-



- 
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, et al. Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nature genetics*. 2009;41(10):1122-6.
- Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nature genetics*. 2007;39(5):631-7.
- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature cell biology*. 2004;6(8):731-40.
- Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, et al. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer science*. 2006;97(2):113-8.
- Hamel S, Bouchard A, Ferrario C, Hassan S, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, et al. Both t-Darpp and DARPP-32 can cause resistance to trastuzumab in breast cancer cells and are frequently expressed in primary breast cancers. *Breast cancer research and treatment*. 2010;120(1):47-57.
- Han W, Woo JH, Jeon YK, Yang SJ, Cho J, Ko E, et al. 17p12 deletion in breast cancer predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(5):799-804. Epub 2012/09/15.
- Han S, Park K, Shin E, Kim HJ, Kim JY, Kim JY, et al. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Oncology reports*. 2010;24(1):121-8.
- Han W, Han MR, Kang JJ, Bae JY, Lee JH, Bae YJ, et al. Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *BMC cancer*. 2006;6:92.
- Hawthorn L, Luce J, Stein L, Rothschild J. Integration of transcript expression, copy number and LOH analysis of infiltrating ductal carcinoma of the breast. *BMC Cancer*. 2010;10:460.
- Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual review of biochemistry*. 2011;80:437-71.
- Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K, et al. Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*. 2008 Aug 1;26(22):3727-34.
-

- Hwang KT, Han W, Cho J, Lee JW, Ko E, Kim EK, et al. Genomic copy number alterations as predictive markers of systemic recurrence in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 Oct 15;123(8):1807-15.
- Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer: Mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2013. Acesso em: 17 de maio de 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
- Ioachim E, Damala K, Tsanou E, Briasoulis E, Papadiotis E, Mitselou A, et al. Thrombospondin-1 expression in breast cancer: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *Histology and histopathology*. 2012;27(2):209-16.
- Ishkanian AS, Zafarana G, Thoms J, Bristow RG. Array CGH as a potential predictor of radiocurability in intermediate risk prostate cancer. *Acta Oncol*. 2010 Oct;49(7):888-94.
- Ito Y, Motoo Y, Yoshida H, Iovanna JL, Takamura Y, Miya A, et al. Decreased expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in breast carcinoma. *Anticancer research*. 2006;26(6B):4391-5.
- Jacot W, Fiche M, Zaman K, Wolfer A, Lamy PJ. The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1836(1):146-57.
- Josse SA, Brandwijk KI, Mulder L, Wesseling J, Hannemann J, Nederlof PM. Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Feb;50(2):71-81.
- Kauraniemi P, Kallioniemi A. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(1):39-49.
- Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2010;11(10):927-33. Epub 2010/09/25.
- Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *The American journal of pathology*. 2010;176(6):2911-20.
- King TD, Suto MJ, Li Y. The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(1):13-8.
- Koca E, Kuzan TY, Dizdar O, Babacan T, Sahin I, Ararat E, et al. Outcomes of locally advanced breast cancer patients with  $\geq 10$  positive axillary lymph nodes. *Medical oncology*. 2013;30(3):615.
-

- 
- Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):255-66.
- Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(37):E2441-50.
- Lamy PJ, Fina F, Bascoul-Mollevis C, Laberrenne AC, Martin PM, Ouafik L, et al. Quantification and clinical relevance of gene amplification at chromosome 17q12-q21 in human epidermal growth factor receptor 2-amplified breast cancers. *Breast cancer research : BCR*. 2011;13(1):R15.
- Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine reviews*. 2011;32(5):597-622.
- Li W, Lee A, Gregersen PK. Copy-number-variation and copy-number-alteration region detection by cumulative plots. *BMC bioinformatics*. 2009;10 Suppl 1:S67.
- Li Y, Zou L, Li Q, Haibe-Kains B, Tian R, Li Y, et al. Amplification of LAPTM4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer. *Nature medicine*. 2010;16(2):214-8.
- Lin D, Watahiki A, Bayani J, Zhang F, Liu L, Ling V, et al. ASAP1, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis. *Cancer research*. 2008;68(11):4352-9.
- Lindvall C, Zylstra CR, Evans N, West RA, Dykema K, Furge KA, et al. The Wnt co-receptor Lrp6 is required for normal mouse mammary gland development. *PloS one*. 2009;4(6):e5813.
- Liu XF, Bera TK, Liu LJ, Pastan I. A primate-specific POTE-actin fusion protein plays a role in apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009;14(10):1237-44.
- Liu CC, Prior J, Piwnicka-Worms D, Bu G. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(11):5136-41.
- Mahmood SF, Gruel N, Chapeaublanc E, Lescure A, Jones T, Reyat F, et al. A siRNA screen identifies RAD21, EIF3H, CHRAC1 and TANC2 as driver genes within the 8q23, 8q24.3 and 17q23 amplicons in breast cancer with effects on cell growth, survival and transformation. *Carcinogenesis*. 2013.
- Morrow PK, Hortobagyi GN. Management of breast cancer in the genome era. *Annu Rev Med*. 2009;60:153-65.
-

- 
- Murphy LC, Seekallu SV, Watson PH. Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(1):R1-14.
- Nair R, Roden DL, Teo WS, McFarland A, Junankar S, Ye S, et al. c-Myc and Her2 cooperate to drive a stem-like phenotype with poor prognosis in breast cancer. *Oncogene*. 2013.
- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):665-76.
- National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2013. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Breast Cancer. Acesso em 20/05/2013. Disponível em: [www.nccn.com](http://www.nccn.com).
- Orr B, Compton DA. A double-edged sword: how oncogenes and tumor suppressor genes can contribute to chromosomal instability. *Frontiers in oncology*. 2013;3:164.
- Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, Lasorsa L, Chuchana P, Rouge C, et al. Genetic profiling of chromosome 1 in breast cancer: mapping of regions of gains and losses and identification of candidate genes on 1q. *British journal of cancer*. 2006;95(10):1439-47.
- Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):227-38.
- Park H, Kim JI, Ju YS, Gokcumen O, Mills RE, Kim S, et al. Discovery of common Asian copy number variants using integrated high-resolution array CGH and massively parallel DNA sequencing. *Nat Genet*. 2010 May;42(5):400-5.
- Pei L, Xie P, Zhou E, Yang Q, Luo Y, Tang Z. Overexpression of DEP domain containing mTOR-interacting protein correlates with poor prognosis in differentiated thyroid carcinoma. *Molecular medicine reports*. 2011;4(5):817-23.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 5:39-48.
- Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009;137(5):873-86.
- Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, et al. Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer*. 2005;104(11):2417-29.
- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the
-

- transcriptional program of human breast tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(20):12963-8.
- Polyak K. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Nov 30;1552(1):1-13.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*. 2011;5(1):5-23. Epub 2010/12/15.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 2;12(5):R68.
- Qu Z, Fu J, Yan P, Hu J, Cheng SY, Xiao G. Epigenetic repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2: implications for the biology and treatment of breast cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(16):11786-92.
- Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009;41(1):40-7. Epub 2008/12/18.
- Redfield SM, Mao J, Zhu H, He Z, Zhang X, Bigler SA, et al. The C-terminal common to group 3 POTES (CtG3P): a newly discovered nucleolar marker associated with malignant progression and metastasis. *American journal of cancer research*. 2013;3(3):278-89.
- Ren TN, Wang JS, He YM, Xu CL, Wang SZ, Xi T. Effects of SMYD3 over-expression on cell cycle acceleration and cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Medical oncology*. 2011;28 Suppl 1:S91-8.
- Rennstam K, Ahlstedt-Soini M, Baldetorp B, Bendahl PO, Borg A, Karhu R, et al. Patterns of chromosomal imbalances defines subgroups of breast cancer with distinct clinical features and prognosis. A study of 305 tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer research*. 2003;63(24):8861-8.
- Rosa FE, Santos RM, Rogatto SR, Domingues MA. Chromogenic in situ hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al]. 2013;46(3):207-16. Epub 2013/04/06.
- Rosa FE, Silveira SM, Silveira CG, Bergamo NA, Neto FA, Domingues MA, et al. Quantitative realtime RT-PCR and chromogenic in situ hybridization: precise methods to detect HER-2 status in breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:90.
- Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2010;10:59–64.
-

- 
- Santos SC, Cavalli IJ, Ribeiro EM, Urban CA, Lima RS, Bleggi-Torres LF, et al. Patterns of DNA copy number changes in sentinel lymph node breast cancer metastases. *Cytogenetic and genome research*. 2008;122(1):16-21.
- Scheuner MT, McNeel TS, Freedman AN. Population prevalence of familial cancer and common hereditary cancer syndromes. The 2005 California Health Interview Survey. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010;12(11):726-35.
- Sellinger M, Neubauer K, William M, Hemmerlein B, Friedrich M, Salehin D. Contralateral metastasis of parotid gland in advanced breast cancer with peripheral facial paralysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Dec;284(6):1557-60.
- Sens-Abuazar C, Napolitano EFE, Osorio CA, Krepschi AC, Ricca TI, Castro NP, et al. Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: Early Events in the Progression of Preinvasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Translational oncology*. 2012;5(2):113-23.
- Shuen AY, Foulkes WD. Inherited mutations in breast cancer genes--risk and response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011 Apr;16(1):3-15.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.
- Staaf J, Jonsson G, Ringner M, Baldetorp B, Borg A. Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2011;13(6):R129.
- Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400-4. Epub 2012/06/23.
- Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer research*. 2013;73(7):2025-30.
- Strand C, Bak M, Borgquist S, Chebil G, Falck AK, Fjallskog ML, et al. The combination of Ki67, histological grade and estrogen receptor status identifies a low-risk group among 1,854 chemo-naive women with N0/N1 primary breast cancer. *SpringerPlus*. 2013;2(1):111. Epub 2013/04/06
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458:719–724.
- Tang YC, Amon A. Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. *Cell*. 2013;152(3):394-405.
-

- Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nature genetics*. 2008;40(5):631-7.
- The Centre for Applied Genomics. Acesso em 20/04/2013 Disponível em: [http://www.tcag.ca/scherer/documents/CNV\\_FAQ.pdf](http://www.tcag.ca/scherer/documents/CNV_FAQ.pdf)
- Thomassen M, Tan Q, Kruse TA. Gene expression meta-analysis identifies chromosomal regions and candidate genes involved in breast cancer metastasis. *Breast cancer research and treatment*. 2009;113(2):239-49.
- Thompson PA, Brewster AM, Kim-Anh D, Baladandayuthapani V, Broom BM, Edgerton ME, et al. Selective genomic copy number imbalances and probability of recurrence in early-stage breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(8):e23543.
- Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998;21(3):177-84.
- Tognon C, Garnett M, Kenward E, Kay R, Morrison K, Sorensen PH. The chimeric protein tyrosine kinase ETV6-NTRK3 requires both Ras-Erk1/2 and PI3-kinase-Akt signaling for fibroblast transformation. *Cancer research*. 2001;61(24):8909-16.
- Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(39):37722-9.
- Vangamudi B, Peng DF, Cai Q, El-Rifai W, Zheng W, Belkhiri A. t-DARPP regulates phosphatidylinositol-3-kinase-dependent cell growth in breast cancer. *Molecular cancer*. 2010;9:240.
- Vanoirbeek E, Eelen G, Verlinden L, Carmeliet G, Mathieu C, Bouillon R, et al. PDLIM2 expression is driven by vitamin D and is involved in the pro-adhesion, and anti-migration and -invasion activity of vitamin D. *Oncogene*. 2013.
- Vasudev P, Onuma K. Secretory breast carcinoma: unique, triple-negative carcinoma with a favorable prognosis and characteristic molecular expression. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(12):1606-10.
- Vaz-Luis I, Winer EP, Lin NU. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(2):283-91.
- Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(2):489-98.
-

- 
- Wang Z, Zhong J, Inuzuka H, Gao D, Shaik S, Sarkar FH, et al. An evolving role for DEPTOR in tumor development and progression. *Neoplasia*. 2012;14(5):368-75.
- Wikman H, Lamszus K, Detels N, Uslar L, Wrage M, Benner C, et al. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14(2):R49. Epub 2012/03/21.
- Winter SF, Lukes L, Walker RC, Welch DR, Hunter KW. Allelic variation and differential expression of the mSIN3A histone deacetylase complex gene *Arid4b* promote mammary tumor growth and metastasis. *PLoS genetics*. 2012;8(5):e1002735.
- Xiong G, Wang C, Evers BM, Zhou BP, Xu R. RORalpha suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression. *Cancer research*. 2012;72(7):1728-39.
- Xu H, Yan M, Patra J, Natrajan R, Yan Y, Swagemakers S, et al. Enhanced RAD21 cohesin expression confers poor prognosis and resistance to chemotherapy in high grade luminal, basal and HER2 breast cancers. *Breast cancer research : BCR*. 2011;13(1):R9.
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The lancet oncology*. 2010;11(2):174-83. Epub 2010/02/16.
- Yin YX, Shen F, Pei H, Ding Y, Zhao H, Zhao M, et al. Increased expression of Rab25 in breast cancer correlates with lymphatic metastasis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012;33(5):1581-7.
- Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*. 2013;27(4):355-71.
- Youlten DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer epidemiology*. 2012;36(3):237-48. Epub 2012/03/31.
- Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J, Zheng W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol*. 2011 May;12(5):477-88
- Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear receptor signaling*. 2008;6:e003. Epub 2008/02/28.
- Zhao B, Li L, Guan KL. Hippo signaling at a glance. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 23):4001-6.
-