UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Giórgia Gobbi da Silveira

Relação entre o gene *B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus
Integration Site 1* (BMI-1) e genes reguladores da recombinação
homóloga em carcinomas ductais invasores da mama

Ribeirão Preto

2012

Giórgia Gobbi da Silveira

Relação entre o gene *B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1* (BMI-1) e genes reguladores da recombinação homóloga em carcinomas ductais invasores da mama

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silveira, Giórgia Gobbi da.

Relação entre o gene *B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1* (BMI-1) e genes reguladores da recombinação homóloga em carcinomas ductais invasores da mama. Ribeirão Preto, 2012.

59 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Ribeiro-Silva, Alfredo.

1. Câncer de mama. 2. Recombinação Homóloga. 3. Carcinoma ductal invasor. 4. BMI-1.

Nome: SILVEIRA, Giórgia Gobbi da

Título: Relação entre o gene *B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1* (BMI-1) e genes reguladores da recombinação homóloga em carcinomas ductais invasores da mama

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho contou com auxílio financeiro do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** (processo 470442/2008-5) e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** (processo 2008/06461-1)

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha **mãe**, razão pela qual estou hoje aqui. Aquela que sempre acreditou em mim, que me amou e apoiou sempre. Que lutou e trabalhou muito pra que eu pudesse chegar onde queria. Por ter sido pai e mãe e por ter me ensinando que, na vida, a gente levanta e anda, sempre! Te amo mãe!

Aos meus irmãos, **Ricardo e Ronan**, pelo amor e carinho que sempre me dispenderam, por toda a constante ajuda, por acreditarem no meu potencial, e por servirem de exemplo pra caçula aqui. Vocês são os melhores irmãos do mundo!!! Amo vocês!

Ao meu amor **João Paulo**, que viu em mim um potencial que nem eu sabia existir. Que despertou o melhor de mim, e me ensinou e ensina muito, a cada dia. Por ser meu melhor amigo e companheiro! Obrigada por todo o amor, carinho, respeito e paciência! Te amo!

Ao meu **pai**, que eu sei que me acompanha, auxilia e torce por mim, de onde estiver! Te amo pai!

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva**, por ter acreditado em meu potencial e me ensinado muito ao longo destes quase três anos de convivência. Pela prontidão e disponibilidade na orientação deste trabalho, o meu sincero muito obrigada!

À minha **querida família**! A todos e a cada um em especial, muito obrigada!!!

Aos meus **avós queridos**, exemplo de luta, perseverança, dignidade e honradez! Vocês são os nossos exemplos! Amo vocês!

Aos meus tios: **Tio Junior, Tio Vagner, Tia Edna, Tia Sônia, Tio Irineu, Padrinho, Tia Edna, Tio João e Tia Zélia** pela inestimável ajuda ao longo desta jornada. Vocês tornaram minha caminhada muito mais leve! Muito obrigada!

Aos meus companheiros de laboratório **João Paulo, Danilo, Juliana e Verônica** pelas risadas, longas conversas e pela constante ajuda! Por tornarem os dias de pós-graduação mais leves e mais tranquilos! É um orgulho ter vocês por perto!

Aos meus amigos e colegas de departamento **João Paulo, Danilo, Juliana, Verônica, João Felipe, Celinha, Mara, Patrícia, Valdecir e Érica**, muito obrigada pela convivência e amizade! Pelos almoços, conversas, lanches, caronas, passeios e risadas e por me fazerem companhia sempre! Muito obrigada!!!

Às minhas amigas queridas **Suély, Marina e Papi**, muito obrigada por tudo!!! São tantas coisas a agradecer que eu nem saberia por onde começar! Obrigada pela infância linda, pelo tempo de faculdade perfeito, e por me acompanharem até hoje. Mesmo que estejamos longe, eu sei que vocês estão sempre perto! Amo vocês!

À **Maria Lúcia**, por ter me ajudado a ver a vida com olhos mais leves e a caminhar com mais serenidade. Por ter trazido pra minha vida a paz e a confiança para caminhar cada vez mais longe! Muito obrigada!!!

À minha orientadora de iniciação científica **Sandra Maria O. M. Veiga**, por ter me ensinado tanto e por ter me dado a oportunidade de conhecer e me apaixonar pelo mundo da ciência! Muito obrigada!

Ao Chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal **Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia** pelo constante interesse em trazer melhorias para o Departamento.

Ao Coordenador da Pós-Graduação **Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva** por ser sempre justo nas suas decisões e pela constante disponibilidade em ajudar e em resolver os problemas que venham a surgir.

Aos funcionários do Departamento **Camila, Rosângela, Felipe, Neide e Toninho**, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar. E por serem sempre tão atenciosos, competentes e educados.

À técnica de laboratório **Deisy Mara Silva** pelo auxílio técnico na realização deste trabalho.

Às funcionárias da limpeza, **Angélica e Miriam**, pela educação, simpatia e por nos propiciarem um agradável ambiente de trabalho.

“Para ser grande, sê inteiro: nada

teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

no mínimo que fazes.”

Fernando Pessoa

RESUMO

SILVEIRA, GG. **Relação entre o gene *B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1* (BMI-1) e genes reguladores da recombinação homóloga em carcinomas ductais invasores da mama.** 2012. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Bmi-1 é uma proteína do grupo Polycomb capaz de induzir atividade de telomerase, levando à imortalização de células epiteliais. As células, quando imortalizadas, se tornam mais susceptíveis a danos em dupla fita (double-strand breaks (DSB)) e a recombinação homóloga é uma das duas vias de reparo dos DSBs. Dentre os genes reguladores da recombinação homóloga temos o BRCA-1, que está envolvido na resposta ao dano associado à proteína RAD51, que por sua vez se acumula rapidamente nos focos de dano ao DNA após a sinalização do H2AX, que têm se mostrado um excelente marcador de dano celular por se acumular rapidamente nos focos de lesão, desencadeando o processo de reparo. Topoisomerase III β (TopoIII β) remove intermediários da recombinação homóloga antes da segregação de cromossomos, prevenindo danos à estrutura do DNA celular. O papel das proteínas envolvidas na recombinação homóloga, em carcinomas ductais invasores positivos para o BMI-1, necessita ser investigado. Utilizando-se *tissue microarrays* contendo 239 casos de carcinomas ductais mamários primários, foi analisada a expressão imunoistoquímica de BMI-1, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, HER-2, Ki67, p53 e BRCA-1, γ H2AX, RAD51 e topoisomerase III β . Positividade para o Bmi-1 foi encontrada em 66 casos (27.6%). A positividade imunoistoquímica do BMI-1 relacionou-se a RE (p=0,004), RP (p<0,001), Ki-67 (p < 0,001), p53 (p=0,003), BRCA-1 (p= 0,003), H2AX (p= 0,024) e TopoIII β (p < 0,001). Concluindo, nossos resultados mostraram haver relação entre o BMI-1 e genes reguladores da HR, sugerindo que a positividade de BMI-1 pode ser um importante evento na recombinação homóloga em carcinomas ductais invasores da mama.

Palavras-chave: BMI-1, carcinoma ductal invasivo, recombinação homóloga, câncer de mama

ABSTRACT

SILVEIRA, GG. **Relationship between the gene B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1 (BMI-1) and homologous recombination regulatory genes in invasive ductal breast carcinomas.** 2012. Master's Dissertation. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2012.

Bmi-1 is a Polycomb group protein which is able to induce telomerase activity, enabling the immortalization of epithelial cells. Immortalized cells shown more susceptible to double-strand breaks (DSB) and the homologous recombination (HR) are one of DSB repair pathways. Among the regulatory genes in HR, there is BRCA1, involved in the response to DNA damage associated with the RAD51 protein, which accumulates in DNA damage foci after signaling H2AX. H2AX has also been shown to be a good marker of DNA damage. Topoisomerase III β (TopoIII β) removes HR intermediates before the segregation of chromosomes, preventing damage to the structure of the cellular DNA. The role of proteins involved in HR, in breast carcinomas positive for BMI-1, remains to be investigated. The aim of this study was evaluate the association between BMI-1 and homologous recombination proteins. Using tissue microarrays containing 239 cases of primary breast tumors, the expression of Bmi-1, BRCA-1, H2AX, Rad51, p53, Ki-67, topoisomerase III β , RE, RP and HER-2 was analyzed by immunohistochemistry. We observe high expression of Bmi-1 in 66 cases (27.6%). Immunohistochemistry overexpression of BMI-1 was related to RE ($p=0,004$), RP ($p<0,001$), Ki-67 ($p < 0,001$), p53 ($p=0,003$), BRCA-1($p= 0,003$), H2AX ($p= 0,024$) and TopoIII β ($p < 0,001$). Our results showed a relation between the expression of BMI-1 and HR regulatory genes, suggesting that overexpression of Bmi-1 is an important event in breast cancer homologous recombination.

Key-words: BMI-1, homologous recombination, invasive ductal carcinoma, breast cancer

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC – Comitê Americano para o Câncer (do inglês *American Joint Comitee on Cancer*)

ATM – ataxia telangiectasia

ATR – ataxia telangiectasia and RAD3-related

BMI-1 – B-Cell-Specific Moloney Murine Leukemia Virus Integration Site 1

BRCA-1 – *Breast cancer gene 1*

CISH – Hibridização cromogênica in situ (do inglês *Chromogenic in situ hybridization*)

DAB – Coloração por diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EP – Erro padrão

EUA – Estados Unidos da América

H&E – Coloração por hematoxilina e eosina

H2AX – H2A histone family, member X

HCFMRP/USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico 2

RH – Recombinação homóloga (do inglês *Homologous recombination*)

IC – Intervalo de confiança

IHQ – Imunoistoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Ki67 – antígeno de proliferação celular

NHEJ – União terminal não-homóloga (do inglês *Non-homologous end-joining*)

p53 – proteína tumoral p53

RAD51 – RAD51 homolog (*S. cerevisiae*)

RE- Receptor de estrógeno

RP- Receptor de progesterona

SECM – Sobrevida específica do câncer de mama

SLD – Sobrevida livre da doença

SLM – Sobrevida livre de metástases

TMA – Microarranjos teciduais (do inglês *Tissue microarray*)

TopoIII β – Topoisomerase III beta

PcG – Polycomb Group

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre dados clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica de BMI-1.

Tabela 2 – Relação entre marcadores imunoistoquímicos e expressão de BMI-1.

Tabela 3 – Análise multivariada da expressão imunoistoquímica do marcador BMI-1 em carcinomas ductais mamários.

Tabela 4 – Relação entre dados clínico-patológicos relacionados à sobrevida e expressão imunoistoquímica de BMI-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura ilustrando a participação da proteína H2AX fosforilada e da proteína BRCA-1 na resolução do dano ao DNA (Adaptado de Huen et al. 2010).

Figura 2 – Figura ilustrando o processo de recombinação homóloga do DNA desde o momento do dano até a reparação através da fita homóloga. Destaque para o papel das proteínas Rad51, H2AX e BRCA-1 (Adaptado de Ohta et al. 2011).

Figura 3 – Microfotografias de carcinoma ductal mamário com ausência (A) e presença (B) de imunexpressão nuclear de BMI-1 (aumento de 400x).

Figura 4 – Microfotografias:

- A- Células neoplásicas positivas para RE (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- B- Células neoplásicas positivas para RP (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- C- Células neoplásicas positivas para p53 (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- D- Células neoplásicas positivas para Ki-67 (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- E- Células neoplásicas positivas para BRCA-1 (imunoistoquímica, marcação nuclear e citoplasmática, aumento de 200X)
- F- Células neoplásicas positivas para Topo III β (imunoistoquímica, marcação de citoplasma, aumento de 400X)
- G- Células neoplásicas positivas para H2AX (imunoistoquímica, marcação de citoplasma, aumento de 400X)
- H- Células neoplásicas positivas para RAD 51 (imunoistoquímica, marcação de citoplasma, aumento de 200X)

Figura 5 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o aparecimento de recorrências ou metástases em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 6 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo até aparecimento de metástases a distância em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 7 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo entre o diagnóstico até a data do óbito em função do índice de pacientes com câncer de mama.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER DE MAMA	17
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA	17
1.2 RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA DO DNA	18
1.3 B CELL-SPECIFIC MOLONEY MURINE LEUKEMIA VIRUS INSERTION SITE 1 GENE	23
2- OBJETIVOS	25
3- MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 CASUÍSTICA	28
3.2 MICROARRANJOS TECIDUAIS (TISSUE MICROARRAYS)	28
3.3 IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ)	29
3.4 HIBRIDIZAÇÃO CROMOGÊNICA IN SITU (CISH)	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4- RESULTADOS	32
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E DOS TUMORES	33
4.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE IMUNOISTOQUÍMICA	35
4.3 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE BMI-1 E SOBREVIVÊNCIA	39
5- DISCUSSÃO	42
6- CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	50

1- INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, somente atrás dos tumores pulmonares, e o mais comum entre as mulheres. A incidência mundial do câncer de mama foi de 1,38 milhão de novos casos (23%) e 458 mil mortes (14%) em decorrência do câncer no ano de 2008. A cada ano, o câncer de mama representa cerca de 22% do total de novos cânceres em mulheres.

Nos Estados Unidos, a estimativa para 2011 é de 232,6 mil novos casos, sendo que destes 230,4 mil casos serão em mulheres, e 40 mil mortes, sendo que, destes 40 mil, 39,5 mil são mulheres. (Siegel et al., 2011)

No Brasil, segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o tumor mais prevalente entre as mulheres e, segundo a estimativa de incidência para o ano de 2012, o câncer de mama representará cerca de 28% dos novos casos de câncer em mulheres no país (INCA, 2011). Posto em números, este percentual representa 53 mil novos casos a serem diagnosticados nos anos de 2012 e 2013.

Nos países desenvolvidos a taxa de incidência se assemelha aos países em desenvolvimento, no entanto as mortes nos países em desenvolvimento representam 60% do total mundial de casos. (Jemal et al., 2011). Acredita-se que o maior número de mortes nos países em desenvolvimento seja devido ao diagnóstico tardio do tumor, tanto por falta de informação da população quanto pela escassez de equipamentos adequados para atender a comunidade, além das dificuldades de acesso ao tratamento do tumor. Estudos como o de Soerjomataram et al (2008) demonstram que políticas de saúde pública associadas à intensa pesquisa em Mastologia têm levado a um aumento significativo na sobrevida dos pacientes.

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama temos a idade, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher e história familiar de câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente após os 50 anos. Dentre os fatores relacionados à saúde da mulher temos menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal. Já com relação à história familiar, pacientes que possuem familiares com histórico de câncer da mama, apresentam um aumento de cerca de duas a três vezes no risco de

desenvolver essa neoplasia. Além dos fatores citados, é sabido que alterações em alguns genes responsáveis pela regulação e pelo metabolismo hormonal e reparo de DNA, como, por exemplo, BRCA1, BRCA2 e p53, aumentam o risco do paciente vir a desenvolver câncer da mama (INCA, 2011; King et al., 2003).

1.2 Recombinação homóloga do DNA

O genoma humano é continuamente desafiado por uma variedade de estresses genotóxicos. Estes insultos levam a rupturas no DNA, podendo levar a formação de danos à fita simples de DNA (ssDNA – do inglês *single-stranded DNA breaks*) e quebras em fita-dupla do DNA (DSB – do inglês *double-stranded DNA breaks*), sendo que o dano à dupla-fita é o tipo mais letal de dano e um reparo ineficiente ou pouco acurado pode levar ao aparecimento de mutações e translocações cromossomais que induzem instabilidade genômica e, em última instância, o surgimento do câncer. Muitos eventos são responsáveis pela formação dos danos à dupla-fita, dentre eles temos a radiação ionizante ou o tratamento com drogas radiomiméticas (Ismail et al., 2007; Rogakou et al., 1998), espécies reativas de oxigênio, medicamentos e modificações no DNA que induzem replicação e/ou transcrição de estresse sofrido pela célula (Takahashi & Ohnishi, 2005; Pommier, 2006; Guirouilh-Barbat et al., 2008; Yuan et al., 2009), além de radiação ultravioleta na fase S do ciclo celular (Marti, et al. 2006, Ward & Chen, 2001). Outro fator externo que pode levar à quebra de dupla-fita é a integração do vírus ao DNA hospedeiro que se segue após a infecção viral (Daniel et al., 2004). O dano à dupla-fita também pode surgir durante eventos fisiológicos como, por exemplo, na meiose (Chicheportiche et al. 2007). Para reverter os danos causados à dupla-fita de DNA, as células possuem dois mecanismos de reparo, a união terminal não-homóloga (do inglês - nonhomologous end-joining pathway) e a recombinação homóloga (RH) (do inglês – homologous recombination). A RH é um processo fundamental, presente em todos os organismos vivos, que auxilia na conservação do genoma, no reparo de cromossomos danificados e na prevenção de falhas na força replicativa. Durante a RH, uma sequência perdida em uma dupla fita de DNA é reparada por uma troca física por uma mesma sequência de uma segunda cópia do DNA (Jasin, 2002).

Adicionalmente a estas vias de reparo, as células também possuem vias de conservação de evolução que são coletivamente conhecidas como resposta a danos do DNA (DDR – do inglês *DNA damage response*). DDR permite à célula reconhecer

os danos ao DNA, propagar os sinais que indicam o dano e ativar cascatas de sinalização que, posteriormente, evocam uma multiplicidade de respostas celulares, incluindo *checkpoints* do ciclo celular para abrandar ou parar células danificadas até a resolução das lesões. Se os danos à dupla-fita persistirem, a célula seguirá para apoptose ou senescência na tentativa de prevenir a duplicação e a partição do DNA danificado em células-filhas (d'Adda di Fagagna, 2008).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm contribuído para a compreensão da estrutura molecular das vias de reparo do DNA. A histona variante H2AX, um histona altamente conservada, que representa de 2.4% a 25% do pool de H2A em células de mamíferos, é um componente-chave da via de recombinação homóloga, que se torna rapidamente fosforilado em seu terminal carboxila para formar o γ H2AX (Rogakou et al., 1998). Estudos mais recentes, como o de Sak & Stuschke (2010), mostraram que os focos de γ H2AX são marcadores sensíveis e precisos do dano à dupla-fita de DNA. Adicionalmente, muitas respostas de danos ao DNA e proteínas de reparo do DNA também se acumulam ao redor dos locais de dano, onde podem ser visualizados como focos de proteína cuja formação foi induzida pelo dano. A formação de focos de muitas destas proteínas de reparo, incluindo BRCA-1 e 2 e RAD51, exige a presença de H2AX, implicando que H2AX desempenha um papel importante na fase inicial da resposta a danos do DNA (Figura 1).

Figura 1. Figura ilustrando a participação da proteína H2AX fosforilada e da proteína BRCA-1 na resolução do dano ao DNA. (Adaptado de Huen et al. 2010)

Rad51 é uma das muitas proteínas que formam discretos focos nucleares em resposta ao dano ao DNA (Haaf, et al., 1995). O uso de técnicas tais como a perda de fluorescência em foto-branqueamento (FLIP) e redistribuição de fluorescência após a fotodegradação (FRAP) em células de mamíferos revelou que, após o dano ao DNA, o Rad51, em estado relativamente estável, se acumula nestes locais, enquanto Rad52 e Rad54 são mais móveis e passam por constante redistribuição dentro do núcleo (Essers et al., 2002). Outro estudo observou que os focos de Rad51 eram nucleares e se encontravam colocalizados com focos de BRCA2 (gene de suscetibilidade ao câncer de mama 2) após a lesão do DNA (Tarsounas et al., 2004). Além disso, a formação dos focos de Rad51 se mostrou dependente da presença do BRCA2, o que implica uma relação causal entre ambos (Yuan et al., 1999). Estudos genéticos definiram RAD51 como essencial para a reparação de danos no DNA por recombinação homóloga. Camundongos *knockout* para RAD51

mostraram letalidade embrionária, e supressão de RAD51 em diferentes linhagens celulares resultou em uma extrema sensibilidade a agentes prejudiciais ao DNA, defeito no reparo do dano à dupla-fita e, finalmente, morte celular (Sonoda et al., 1998; Tsuzuki et al., 1996). A montagem de um filamento de nucleoproteína Rad51 cataliticamente ativa na fita simples de DNA é necessária para que a recombinação homóloga ocorra; isto porque estes filamentos de nucleoproteínas são formados durante a quebra das dupla-fitas de DNA e, uma vez formado, o filamento irá procurar por fitas de DNA homólogas à que necessita ser reparada e a troca de fitas resultará na formação de uma molécula de junção entre o DNA danificado e o homólogo não danificado. Desta maneira, haverá a síntese de uma nova fita de DNA e o subsequente reparo do dano, conforme ilustrado na figura 2 (van Gent, 2001).

O papel essencial do BRCA1 na resposta ao dano ao DNA foi previamente demonstrado através de células-tronco embrionárias e fibroblastos carregando uma deleção alvo do exon 11 do gene BRCA1 (Figura 2). O exon 11 é o maior exon necessário para a interação com RAD51, um participante crítico da RH, conforme descrito anteriormente (Scully et al., 1997) e as células que não possuíam o exon 11 apresentavam defeitos no checkpoint da transição G2/M do ciclo celular (Xu et al., 1999) e no reparo do dano à dupla-fita de DNA por RH (Moynahan et al., 1999).

O gene BRCA1 codifica uma proteína de 1863 aminoácidos (Miki et al., 1994) que é composta de um domínio *RING-finger* na sua região *N-terminal* e domínios BRCT em sua região *C-terminal*, além de uma região codificada pelo exon 11 entre as regiões terminais. O domínio *RING-finger N-terminal* interage com o BARD1, que também contém um domínio RING N-terminal (Brzovic et al., 2001; Wu et al., 1996). O heterodímero RING BRCA1-BARD1 existe em todos os complexos BRCA1 como um componente principal do complexo e esta interação com a proteína BARD1 é necessária para a estabilidade da proteína BRCA1, para sua localização nuclear, e também para sua atividade de ubiquitina E3 ligase. O BRCA1 forma também um complexo com o BRCA2 através de uma interação em ponte (Si et al., 2009; Zhang et al., 2009). Desta maneira, podemos observar que o BRCA1 forma diversos complexos de proteínas-chave que funcionam distintamente, porém de forma cooperativa na resposta ao dano no DNA. Devido a sua atividade de ubiquitina E3 ligase, acredita-se que o BRCA1 seja responsável pela ubiquitinação de proteínas no local de lesão, facilitando a resposta ao dano (Chen et al., 2002; Morris &

tanto na sua forma espontânea quanto na forma induzida por estresse (Sengupta & Harris, 2005). Após o dano celular, os níveis de p53 aumentam exponencialmente, o que induz a parada do ciclo celular ou morte celular por apoptose. Existem indícios de que o p53 seria responsável por checar o andamento da RH, reconhecendo locais com defeitos e restringindo a troca de bases entre sequências imperfeitas, além de suprimir os rearranjos capazes de causarem alterações tumorigênicas (Dudenhöffer et al., 1998).

A síntese de DNA (fase S do ciclo celular) está associada à formação de cortes e fendas no DNA, com consequente colapso das forças de replicação nos locais de fenda. Estas modificações na estrutura do DNA podem alterar a estabilidade cromossômica e causar mutações, caso não sejam resolvidas a tempo. Além disso, diversos problemas de torção do DNA estão associados à síntese de DNA, como o estresse torsional formado durante o avanço da força de replicação, a fusão de fitas devido a seu maior entrelaçamento e a formação de estruturas circulares capazes de impedir o avanço da força. Todos estes eventos são solucionados com o auxílio das topoisomerases, que além de auxiliar durante a fase S também auxiliam durante a condensação de cromossomos e a segregação, nas fases G2 e M do ciclo celular (Branzei & Foiani, 2008).

A topoisomerase III β demonstrou desempenhar um papel ativo na recombinação homóloga (Kwan *et al.*, 2003). Alguns tipos de dano aos cromossomos acarretam em forte impedimento para a replicação, e a recombinação do DNA comprometido com sua cromátide irmã é capaz de restabelecer a força de replicação e dar continuidade ao processo de divisão celular (Michel *et al.*, 2004; Sengupta & Harris, 2005). No único estudo investigando a expressão de topoisomerase III β em tumores mamários, Oliveira-Costa *et al.* demonstraram que a expressão de topoisomerase III β está relacionada a uma disfunção em BRCA1 e p53, indicando um possível papel da recombinação homóloga no desenvolvimento de tumores de mama (Oliveira-Costa *et al.*, 2010).

1.3 B cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1 gene (Bmi-1)

O *Polycomb group protein* (PcG) é uma família de proteínas que está envolvida na manutenção de células tronco adultas e embrionárias e no desenvolvimento do câncer (Valk-Lingbeek et al., 2004). As proteínas do grupo

Polycomb são complexos repressores transcricionais multiméricos e podem silenciar os genes promotores do desenvolvimento, conferindo à célula característica de célula-tronco de uma maneira PcG-dependente.

B cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1 gene (Bmi-1), o primeiro gene da família PcG a ser descoberto, tem demonstrado um importante papel em processos biológicos, tais como estabilização e diferenciação de células-tronco, formação de órgãos, desenvolvimento embrionário (Van der Lugt et al., 1994) e carcinogênese de vários tecidos, incluindo câncer de pâncreas, câncer de mama e câncer gástrico (Dhawan et al., 2009; Kim et al., 2004; Liu et al., 2008). Estudos têm demonstrado que o Bmi-1 suprime o locus INK4^a, que é responsável por codificar proteínas como a p16^{INK4a} e a p19^{ARF}. Estas proteínas são responsáveis por induzir paradas no crescimento celular, senescência celular e apoptose, destacando um papel crucial do Bmi-1 na atividade de auto-renovação celular (Kamijo et al., 1997; Jacobs et al., 1999).

Uma das principais características do câncer é a instabilidade genética, responsável por mutações que podem dar origem a células aberrantes com fenótipos mais agressivos. Em condições normais, as células, quando não são capazes de iniciar o processo de apoptose, podem tornar-se mais suscetíveis a danos ao DNA, como danos de fita simples (single strand-break (SSB)) ou fita dupla de DNA (double strand-break (DSB)). Recentemente, Gijjala et al (2011) demonstraram que o BMI-1 é recrutado para sítios de quebras de DNA e participa da ubiquitinação dano-induzida de H2AX, permitindo inferir um papel do BMI1 na resposta ao dano no DNA, que em células de mamíferos, é corrigido através da recombinação homóloga (RH) e da união terminal não-homóloga (em inglês *non-homologous end-joining*, *NHEJ*). Visto que a recombinação homóloga é a principal via de reparo de danos à dupla-fita e que o BMI-1 aparenta possuir papel relevante na formação deste tipo de dano, o objetivo deste trabalho foi investigar a interação entre o BMI-1 e as proteínas reguladoras da recombinação homóloga nos carcinomas ductais de mama, além de sua relação com a sobrevida dos pacientes, com achados clínico-patológicos e com fatores prognósticos como receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidermal-2 (HER-2) e o marcador de proliferação celular Ki-67.

2- OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivos verificar:

1. A expressão imunoistoquímica do Bmi-1 nos carcinomas ductais invasores da mama;
2. A relação entre a expressão do Bmi-1 e a expressão proteica dos genes BRCA1, H2AX, RAD51, p53 e Top3 β ;
3. A relação entre a expressão do Bmi-1 e a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona), a expressão do HER-2 e o índice proliferativo (Ki-67);
4. A relação entre a expressão do Bmi-1 com parâmetros clinicopatológicos de importância prognóstica nos carcinomas mamários;
5. A relação entre a expressão do Bmi-1 com sobrevida livre da doença, sobrevida livre de metástases e sobrevida específica do câncer de mama.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo incluiu 239 casos de carcinomas ductais invasores da mama feminina, diagnosticados entre 1992 e 2005, que foram coletados do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes informações: idade, status menopausal, tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos regionais, recorrência, metástases à distância, morte, sobrevida livre da doença (SLD), sobrevida livre de metástases (SLM) e sobrevida específica do câncer de mama (SECM). Sobrevida livre da doença foi definida como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o aparecimento de recorrências ou metástases, em meses; sobrevida livre de metástases foi considerada como o tempo entre o diagnóstico e o aparecimento de metástases à distância, também em meses, e a sobrevida específica do câncer de mama foi definida como o número de meses desde o diagnóstico até a morte devido ao câncer de mama. Nenhum dos pacientes havia recebido nenhum tipo de tratamento anterior ao diagnóstico. Casos com outras causas de morte foram excluídos do estudo. Também foram excluídos os casos que não possuíam todos os dados clinicopatológicos, laudo de biopsias ou material suficiente para proceder à imunoistoquímica.

Os casos selecionados foram graduados histologicamente de acordo com as definições de Scarff-Bloom & Richardson e modificados por Elston & Ellis (Fitzgibbons et al., 2000), que consiste em três componentes (diferenciação celular, pleomorfismo e índice mitótico). Cada componente recebe uma pontuação de 1 a 3 e são somados e categorizados como grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) ou grau III (indiferenciado). O protocolo de estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki, em 1975, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local.

3.2 Microarranjos Teciduais (Tissue Microarrays)

A área do tumor selecionada para a construção do microarranjo tecidual foi definida pelo patologista Dr. Alfredo Ribeiro-Silva, através de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E), de modo a selecionar a área mais significativa de cada

amostra. Posteriormente, a área selecionada foi utilizada para a construção do microarranjo tecidual (TMA, do inglês *tissue microarray*) em bloco de parafina. A construção do bloco de microarranjo tecidual foi realizada pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, da Fundação Antônio Prudente. Para a construção do TMA, amostras das biópsias, de um mm cada, foram retiradas dos blocos doadores e transferidas para o bloco receptor, utilizando o aparelho Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). Foram realizados cortes de três micrômetros do bloco de microarranjos utilizando o sistema *Paraffin Tape-transfer System* (Instrumedics, Saint Louis, USA). Um dos cortes foi corado com H&E para confirmar a presença de tumor por microscopia de luz. As reações de imunoistoquímica foram realizadas em duas diferentes lâminas para aumentar a confiabilidade dos resultados.

3.3 Imunoistoquímica (IHQ)

Todas as amostras teciduais foram fixadas em formalina neutra 4% e embebidas em parafina. As reações de IHQ foram realizadas utilizando-se o kit Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK). Os cortes foram desparafinados em xileno e reidratados em uma série de alcoóis. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0.3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Os cortes foram, então, submetidos à reativação antigênica em um tampão citrato a 10mM e colocados em panela de pressão por 40 minutos. Após a recuperação antigênica, as amostras foram resfriadas por 30 minutos e encubadas a 4 °C overnight com o anticorpo primário. A diluição e a marca dos anticorpos utilizados neste estudo foram: BMI-1 (1:50, H99, Santa Cruz), H2AX (1:100, 3F2, Abcam), BRCA1 (1:50, clone MS13, Serotec, Oxford, UK), topoisomerase III β (1:100, policlonal, Santa Cruz, Palo Alto, USA), p53 (1:50, clone DO-7, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), RAD51 (1:100, 51RAD01, Abcam), receptor de estrógeno (RE) (1:100 clone 6F11, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), receptor de progesterona (RP) (1:100, clone 16, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), Ki67 (1:100, clone MM1, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), e c-erbB-2 (HER-2) (1:100, clone CB11, Novocastra, Newcastle upon Tyne).

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o bloqueio pós-anticorpo primário por 30 minutos e incubados com o polímero por mais 30 minutos (ambos parte do kit Novolink™ Max Polymer Detection System). A reação foi corada por diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina. Os cortes foram, então, desidratados em uma série de alcoóis e montados em Permount (Fischer, Fairlawn, NJ).

Amídalas foram utilizadas como controle positivo para BMI-1, Ki-67, RAD51, H2AX and topoisomerase III β . Casos de carcinomas ductais sabidamente positivos para p53, RE, RP, BRCA1 e HER-2 foram utilizados como controles positivos para esses marcadores. Controles negativos foram preparados suprimindo-se os anticorpos primários.

Para o marcador BMI-1, qualquer marcação nuclear no epitélio do carcinoma mamário foi considerada positiva (Joensuu et al., 2011), porém, para fins estatísticos, os casos foram divididos segundo percentual de marcação nuclear. Casos sem nenhuma marcação foram classificados como 0, casos com 0,1- 10 % de positividade foram classificados como 1, casos com 10 – 50% de positividade foram classificados como 2 e casos com marcação acima de 50% foram classificados como 3. A expressão de receptor de estrógeno e progesterona foi determinada segundo Fitzgibbons et al., (2000), onde casos com mais de 10% de células neoplásicas apresentando marcação nuclear foram consideradas positivas. Os casos em que mais de 10% das células neoplásicas foram marcadas para Ki-67 (marcação nuclear) foram considerados com um alto índice proliferativo. Os casos foram interpretados como p53 e H2AX positivos quando mais de 10% das células neoplásicas mostravam marcação nuclear e BRCA1 e RAD51 positivos quando mais de 10% das células neoplásicas mostravam marcação citoplasmática (Fitzgibbons et al., 2000; Mangia et al., 2009; Mitra et al., 2009; Oka et al., 2010). Para TopoIII β nós utilizamos mais de 30% das células neoplásicas com marcação citoplasmática (Di Leo et al., 2001).

A expressão de HER-2 foi graduada de acordo com a proporção de marcação de membrana. O escore 0 foi aplicado quando não havia marcação ou menos de 30% das membranas apresentavam marcação. O escore 1+ englobava marcação fraca ou parcial da membrana em mais de 30% das células. A expressão foi considerada 2+ quando havia marcação de fraca a moderada em mais de 30% das

células tumorais. O escore 3+ foi utilizado quando houve marcação forte e completa das membranas de mais de 30% das células. Carcinomas com escore 0 e 1+ foram considerados negativos e com escore 3+ foram considerados positivos. Casos com classificação 2+ foram submetidos à hibridização cromogênica in situ (CISH) para HER-2 e o centrômero do cromossomo 17.

3.4 Hibridização cromogênica in situ (CISH)

Foram realizados cortes de 3 μ m nos blocos de TMA utilizando-se o sistema *Paraffin tape-transfer* (Instrumedics, Saint Louis, USA). O kit ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 probe (Zytovision, Bremerhaven, Germany) foi utilizado para a detecção do gene de HER-2 e do cromossomo 17 (CEN 17). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Usando este kit, dois sinais verdes (HER-2) e dois vermelhos (CEN 17) eram esperados em um núcleo normal. HER-2 foi considerado amplificado quando a relação HER-2/CEN 17 era ≥ 2 na média de 60 células (Wolff et al., 2007). Para fins estatísticos, apenas casos classificados como 2+ foram submetidos à hibridização, e aqueles com amplificação no CISH foram considerados positivos.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa PASW Statistics 18.0 (Chicago, IL, USA). A relação entre a topoisomerase BMI-1, achados imunoistoquímicos e clinicopatológicos foi avaliada utilizando-se tabelas cruzadas e aplicando-se o teste de χ^2 (três ou mais variáveis) ou teste exato de Fisher (duas variáveis) e todos os testes foram realizados em duplicata. O modelo de Kaplan-Meier com o teste de log-rank foi utilizado para estimar e comparar a sobrevida específica da doença, a sobrevida livre de doença e a sobrevida livre de metástases. Para observar o valor prognóstico independente do BMI-1 foi realizado um Modelo de Riscos Proporcionais de Cox (Cox, 1972). Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

4- RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes e dos tumores

Dos mais de 400 casos coletados para este experimento, foram excluídos os casos que não possuíam material suficiente para as reações de imunoistoquímica ou que não apresentavam todas as informações clínicas necessárias (idade, status menopausal, tamanho do tumor, metástases em linfonodos regionais, recorrência, metástases à distância e morte) para o desenvolvimento do projeto. Desta maneira, a casuística final, incluída neste trabalho, foi de 239 casos. O estudo incluiu apenas casos de carcinoma ductal invasor de mama.

A idade das pacientes variou entre 28 e 91 anos, sendo a média de 55,8 anos. Do total de 239 pacientes, 86 (35,98%) eram pré-menopausadas e 153 (64,02%) eram pós-menopausadas. O tamanho do tumor variou de 0,5 a 18 cm (média de 4,7 cm). Os tumores foram classificados como grau 1 (85 [35,56%]), grau 2 (118 [49,37%]) e grau 3 (36 [15,6%]). De acordo com o *Clinical Staging System* descrito em 2003 por Singletary et al. (2003), 32 pacientes (13,39%) foram classificados como estágio I, 57 (23,85%) como IIa, 50 (20,92%) como IIb, 24 (10,04%) como IIIa, 62 foram classificados como IIIb (25,94%), e 14 como estágio IV (5,86%). Sete pacientes apresentavam tumores medindo menos de 2 cm, 100 apresentavam tumores medindo entre 2 e 5 cm e 69 apresentavam tumores maiores que 5 cm. Metástases à distância ocorreram em 75 (31,38%) pacientes e 80 (33,47%) morreram devido ao câncer de mama (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação entre dados clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica de BMI-1

Característica	BMI-1				p-valor
	0	1	2	3	
Idade (anos)					0.278
<50	66	5	16	12	
>50	107	7	12	14	
Status menstrual					0.445
Pré-menopausal	59	3	13	11	
Pós-menopausal	114	9	15	15	
Tamanho do tumor (cm)					0.714
<2	51	2	11	6	
2-5	71	7	11	11	
>5	51	3	6	9	
Graduação histológica (B & R)					0.369
I	65	6	8	6	
II	80	5	18	15	
III	28	1	2	5	
Estadiamento clínico					0.435
I	18	3	5	6	
IIa	41	4	5	7	
IIb	40	1	7	2	
IIIa	19	2	1	2	
IIIb	43	2	8	9	
IV	12	0	2	0	
Comprometimento de linfonodos					0.699
Sim	94	8	15	12	
Não	79	4	13	14	
Metástase					0.589
Sim	58	2	8	7	
Não	115	10	20	19	

Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes

4.2 Resultados das análises de imunoistoquímica

Das 239 amostras estudadas, positividade para BMI-1 foi encontrada em 66 (27.62%) casos (Figura 3). O índice de marcação quantitativo variou entre 0% e 100% de células marcadas em seu núcleo. Os marcadores hormonais RE e RP apresentaram índices de positividade de 65,69% (157 casos) e 60,25% (144 casos), respectivamente. HER2 foi positivo em 48 casos (20,08%) (após análise CISH) e a positividade de Ki67 foi observada em 85 casos (35.56%). Dentre os genes reguladores da recombinação homóloga, encontramos positividade para BRCA-1 em 146 casos (61,09%), RAD51 em 76 casos (31,80%), p53 em 154 casos (64,44%), H2AX em 145 casos (60,67%) e TopoIII β em 128 casos (53,56%) (Figura 4).

Os tumores que apresentaram marcação imunoistoquímica positiva para o BMI-1, não mostraram relação com os parâmetros: idade ($p=0.278$), *status* menstrual ($p=0.445$), tamanho do tumor ($p=0.714$), graduação do tumor (Bloom & Richardson) ($p=0.369$), estágio clínico ($p=0.435$), *status* de acometimento linfonodal ($p=0.699$), metástase ($p=0.589$) ou morte ($p=0.643$) (Tabela 1).

Os resultados imunoistoquímicos mostraram que a positividade de BMI-1 associou-se a RE ($p = 0,004$), RP ($p < 0,001$), Ki-67 ($p < 0,001$), p53 ($p = 0,003$), BRCA-1 ($p = 0,003$), H2AX ($p = 0,024$) e TopoIII β ($p < 0,001$), mas não teve uma correlação significativa com RAD51 ($p = 0,417$) ou HER2 ($p = 0,225$).

Figura 3 – Microfotografias de carcinoma ductal mamário com ausência (A) e presença (B) de imunoexpressão nuclear de BMI-1 (aumento de 400x).

Figura 4 – Microfotografias:

- A- Células neoplásicas positivas para RE (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 10X – *scanner* Aperio®)
- B- Células neoplásicas positivas para RP (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 10X – *scanner* Aperio®)
- C- Células neoplásicas positivas para p53 (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 20X – *scanner* Aperio®)
- D- Células neoplásicas positivas para Ki-67 (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de 20X – *scanner* Aperio®)
- E- Células neoplásicas positivas para BRCA-1 (imunoistoquímica, marcação citoplasmática, aumento de 10X – *scanner* Aperio®)
- F- Células neoplásicas positivas para Topo III β (imunoistoquímica, marcação de citoplasma, aumento de 10X – *scanner* Aperio®)
- G- Células neoplásicas positivas para H2AX (imunoistoquímica, marcação nuclear, aumento de aumento de 400X – microscopia óptica)
- H- Células neoplásicas positivas para RAD51 (imunoistoquímica, marcação de citoplasma, aumento de 200X – microscopia óptica)

Tabela 2 – Relação entre marcadores imunohistoquímicos e expressão de BMI-1

Marcador	BMI-1				P-valor
	0	1	2	3	
RE					0.004^a
Pos	102	9	23	23	
Neg	71	3	5	3	
RP					<0.001^a
Pos	89	10	21	24	
Neg	84	2	7	2	
Ki67					<0.001^a
Pos	49	6	10	20	
Neg	124	6	18	6	
p53					<0.003^a
Pos	102	8	19	25	
Neg	71	4	9	1	
HER-2					0.225
Pos	144	9	19	19	
Neg	29	3	9	7	
BRCA1					0.003^a
Pos	94	8	21	23	
Neg	79	7	4	3	
H2AX					0.024^a
Pos	99	7	16	23	
Neg	74	5	12	3	
TopoIIIβ					<0.001^a
Pos	80	10	16	22	
Neg	93	2	12	4	
RAD51					0.417
Pos	52	3	9	12	
Neg	121	9	19	14	

* Valores de p<0.05 foram considerados significantes

4.3 Relação entre a expressão de BMI-1 e sobrevida

O período de seguimento das pacientes incluídas no estudo variou de 1 a 164 meses (média de 67.3 meses). Utilizando-se a análise de sobrevida de Kaplan-Meier com o teste de *log-rank*, não encontramos diferenças estatisticamente significantes para sobrevida livre de doença no grupo positivo para BMI-1 ($p=0.51$), sobrevida livre de metástases ($p=0.583$), e sobrevida específica do câncer de mama ($p=0.642$) (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o aparecimento de recorrências ou metástases em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 6 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo até aparecimento de metástases a distância em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 7 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo entre diagnóstico até data do óbito em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Na análise multivariada, a expressão imunoistoquímica do BMI-1 não foi capaz de prever a sobrevida de maneira significativa neste grupo de pacientes (Tabela 3 – área selecionada da tabela completa da análise multivariada).

Tabela 3. Análise multivariada da expressão imunoistoquímica do marcador BMI-1 em carcinomas ductais mamários (área selecionada da tabela completa da análise multivariada).

Variável	HR	IC 95% para HR		Significância
		Menor	Maior	
BMI-1 (1)	0.717	0.283	1.817	0.483
BMI-1 (2)	0.629	0.114	3.462	0.549
BMI-1 (3)	0.858	0.278	2.651	0.791

Tabela 4 – Relação entre dados clínico-patológicos relacionados à sobrevida e expressão imunoistoquímica de BMI-1

Característica	BMI-1				p-valor
	0	1	2	3	
Recorrência					1.000
Sim	22	1	5	3	
Não	151	11	23	23	
Morte					0.643
Sim	60	2	9	9	
Não	113	10	19	17	

5- DISCUSSÃO

Muito esforço tem sido empreendido na tentativa de compreender a maneira com que o câncer se desenvolve nos seres humanos. Desta maneira, nosso grupo optou por estudar a importância do BMI-1 na recombinação homóloga do DNA, visto que falhas na RH têm sido reportadas como potencialmente tumorigênicas. No presente estudo encontramos uma forte associação entre BMI-1 e proteínas reguladoras da recombinação homóloga do DNA. Verificamos ainda a associação entre o BMI-1 e características clínico-patológicas, além de sua associação a fatores prognósticos clássicos dos carcinomas ductais mamários. Em nosso estudo o BMI-1 relacionou-se ao RE ($p=0.004$) e RP ($p<0.001$), variáveis conhecidas por estarem associadas com a evolução do paciente, porém não se relacionou com HER-2, idade, status menopausal, tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos regionais, recorrência, metástases à distância e morte. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Joensuu et al. (2011), em que o BMI-1 mostrou-se significativamente relacionado ao status de RE, mas não com os outros parâmetros clínicos analisados no estudo. Um outro estudo desenvolvido por Kim et al. (2004) demonstrou uma forte associação entre a positividade do RE e do BMI-1. O estudo demonstrou ainda associação entre a expressão de BMI-1 e acometimento de linfonodos, mas não encontrou relação com expressão de receptor de progesterona, *status* de HER-2 ou outras características clínicas (Kim et al., 2004). Por outro lado, Yang et al. (2010) encontraram que a forte expressão de BMI-1 está relacionada a um pior curso clínico em pacientes com carcinoma de ovário (Yang et al., 2010).

Estudos recentes relatam possíveis funções do BMI-1 nos processos de resposta ao dano ao DNA (Liu et al., 2009; Facchino et al., 2010; Gijjala et al., 2011). Liu et al. (2009) demonstraram que o BMI-1 regula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria e, neste estudo, a perda do BMI-1 levou ao aumento de dano ao DNA mediado pelo aumento de EROs, induzindo a ativação dos checkpoints no ciclo celular (Liu et al., 2009). Em células de glioblastoma, a perda de BMI-1 prejudica de maneira severa a resposta celular às quebras de fita-dupla de DNA, desta maneira, estas células apresentam uma maior sensibilidade à radiação proveniente de tratamento à base de radioterapia. Por outro lado, a superexpressão do BMI-1 mostrou aumentar a capacidade celular de resposta à quebra de dupla-fita de DNA, tornando a célula do tumor mais resistente

à radiação, indicando que as células tumorais positivas para o BMI-1 são mais resistentes ao tratamento radioterápico (Facchino et al., 2010).

Em nosso trabalho não encontramos relação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica do BMI-1 e sobrevida livre da doença (SLD), sobrevida livre de metástases (SLM) e sobrevida específica do câncer de mama (SECM). No entanto, em seu trabalho, Du et al. (2010) demonstraram através de imunoistoquímica e RT-PCR, que o BMI-1 foi capaz de predizer uma pior sobrevida em pacientes com carcinoma de cólon, indicando inclusive que o BMI-1 possa vir a ser um bom marcador de prognóstico nos pacientes com este tipo de tumor. O mesmo foi relatado no trabalho de Song et al. (2010), que descreveu através de imunoistoquímica e cultura celular que o BMI-1 está diretamente relacionado ao aumento da proliferação celular e pior prognóstico em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas, podendo atuar como um preditor de pior sobrevida nos pacientes com este tipo de tumor. Já com relação aos tumores mamários, Pietersen et al. (2009) demonstraram que o BMI-1 está diretamente relacionado a um bom prognóstico. O mesmo se deu no trabalho de Choi et al. (2009), que encontrou relação entre uma melhor sobrevida e positividade para o BMI-1 em tumores mamários. Já Silva et al. (2007), demonstraram que o BMI-1 está relacionado a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama primário.

Ginjala et al. (2011) demonstraram que o BMI-1 é recrutado para sítios de dano ao DNA de modo a tornar mais eficiente a recombinação homóloga. Em seu trabalho, eles demonstraram que a manutenção do BMI-1 nos sítios de dano é dependente da fosforilação da histona H2AX (Ginjala et al., 2011). Em nosso estudo, nós demonstramos que a expressão imunoistoquímica de BMI-1 está diretamente associada à expressão de H2AX, corroborando os achados de Ginjala et al., que mostram que BMI-1 está intimamente relacionado à maquinaria de reparo da quebra de fitas duplas de DNA. Nossos resultados mostraram ainda haver relação direta entre a positividade do BMI-1 e da proteína BRCA-1. O gene *BRCA1*, apesar de seu papel na síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (em inglês *HBOCS*), também possui um importante papel na regulação da recombinação homóloga como mecanismo de reparo de quebras na fita de DNA. O padrão de marcação imunoistoquímica do BRCA1 é diferente nos carcinomas mamários em relação ao tecido mamário normal. Enquanto a marcação no epitélio normal é exclusivamente

nuclear, a nos carcinomas pode ser exclusivamente nuclear, predominantemente nuclear, predominantemente citoplasmática ou exclusivamente citoplasmática. Na célula normal a proteína codificada pelo BRCA1 é sintetizada no citoplasma e transportada até o núcleo, onde desempenha seu papel regulador do ciclo celular. Acredita-se que no carcinoma ocorra um defeito nesse transporte, justificando sua expressão citoplasmática (RIBEIRO-SILVA, 2005). Uma vez que o BRCA-1 não é capaz de ser transportado até o núcleo, suas funções se tornam comprometidas, dificultando o desempenho da recombinação homóloga nos tumores.

Nosso trabalho demonstrou haver relação direta entre a expressão de p53 e BMI-1 nos tumores mamários estudados, porém, na técnica de imunoistoquímica, a presença de marcação para p53 indica uma forma truncada ou mutada da proteína, visto que em condições normais ela é rapidamente degradada por MDM2 após cumprir sua função. Nossos resultados demonstram que tumores com baixa expressão de BMI-1 apresentam negatividade imunoistoquímica para p53, isto é, a forma ativa de p53. Por outro lado, carcinomas com positividade para BMI-1 apresentaram positividade para p53, indicando que estes tumores apresentam também formas truncadas ou mutadas de p53, o que poderia se refletir em defeitos durante o reparo do dano ao DNA.

Os resultados que relacionam a positividade do BMI-1 ao BRCA1 mutante e à p53 inativa, associado ao resultado do γ -H2AX, indicam que quando o BMI-1 está superexpresso, γ -H2AX também se apresenta altamente expresso, provavelmente devido à ausência de função de BRCA1 e p53, que são conhecidamente necessários para uma recombinação homóloga eficiente, permitindo relacionar o BMI-1 ao reparo ineficiente do dano à dupla-fita de DNA através da recombinação homóloga. Adicionalmente, a presença de γ -H2AX, p53 inativa e BRCA-1 mutante poderia prover informações a respeito do dano ao DNA não solucionado em carcinomas mamários, permitindo novas considerações a respeito da maquinaria de resposta ao dano ao DNA em carcinomas ductais mamários positivos para o BMI-1

Na tentativa de manter a instabilidade cromossômica, as células possuem a capacidade de reconhecer o dano infringido ao DNA, sinalizá-lo para as proteínas de reparo, induzir a ativação de checkpoints para impedir a célula de continuar o ciclo celular, além de iniciar o processo de reparação ou induzir a apoptose. As células

que superexpressam o BMI-1 são conhecidas pela sua incapacidade de iniciar o processo de apoptose e, associadas aos nossos achados em relação ao BRCA-1 mutado e a p53 inativa, estas células poderiam estar mais susceptíveis a mutações adicionais, o que poderia aumentar a agressividade do tumor. Nós também demonstramos haver relação entre a positividade do BMI-1 e a positividade do marcador de proliferação celular Ki-67. O Ki-67 tem sido o marcador de proliferação mais bem estudado em tumores mamários, e estudos indicam que sua expressão está associada a um maior índice de recorrência e a uma pior sobrevida em pacientes com câncer de mama, embora não tenha sido observado um valor prognóstico independente (TRIHIA et al., 2003; de AZAMBUJA et al., 2007). O tecido mamário sem alteração neoplásica apresenta baixa expressão de Ki67, ao contrário do tecido neoplásico de alguns subtipos mais agressivos de tumores mamários (YERUSHALMI et al., 2010). Desta maneira, podemos inferir que as células BMI-1 positivas estão em ampla proliferação e, sendo a proliferação um fator responsável por tornar a célula mais susceptível a mutações adicionais, a célula em ampla proliferação também apresenta maior chance de apresentar um perfil mais agressivo. E, embora nossos resultados com relação à sobrevida e metástase não tenham sido estatisticamente significantes, os achados imunoistoquímicos corroboram os resultados de Guo et al (2011). Guo et al. aplicaram células cultivadas BMI-1^{-/-} em animais *nude*, e observaram que quando o BMI-1 é suprimido, há uma redução na progressão tumoral e no surgimento de metástase espontânea em pulmão. Eles observaram ainda que o BMI-1 está relacionado à invasão celular e que sua elevada expressão está diretamente associada à estágios avançados do câncer de mama.

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a estudar a relação entre BMI-1 e a proteína RAD51, uma proteína fundamental para o correto funcionamento da maquinaria da recombinação homóloga. Nossos resultados mostraram não haver relação estatística significativa entre a expressão destas proteínas, o que pode indicar que a proteína RAD51 não foi corretamente retida no local do dano, visto que a presença de BRCA1 ativo é essencial para a retenção do RAD51 nos sítios de dano à dupla-fita de DNA (Ohta, 2011) e, na reação de imunoistoquímica, o BRCA-1 que sofre reação encontra-se mutado, conforme descrito anteriormente.

Apesar de Mohanty e colaboradores (2008) demonstrarem que culturas celulares de fibroblastos embrionários murínicos (MEF - do inglês *murine embryonic fibroblasts*) deficientes em topoisomerase III β (topoIII $\beta^{-/-}$) apresentam redução na eficiência do checkpoint da transição G1/S, nossos achados em tecido humano conservado em parafina indicaram uma associação entre o BMI-1, que leva à perda do checkpoint da transição G1/S devido à sua capacidade de inativar o *locus* INK4^a, e a positividade da topoisomerase III β . Estes achados, aliados à presença de p53 inativa, nos levam a crer que as células poderiam progredir através do ciclo celular sem sofrer nenhuma parada/checkpoint na transição G1/S, levando a um risco aumentado de danos, o que requereria a presença da TopoIII β para tentar resolver o dano antes que o ciclo celular continuasse. A positividade de γ H2AX poderia indicar a presença de uma TopoIII β ineficaz, tornando necessária a recombinação homóloga em carcinomas ductais invasores da mama.

Desta maneira, os achados do nosso trabalho indicam que o BMI-1 possui um importante papel na recombinação homóloga de pacientes com carcinoma ductal mamário. No entanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nesta interação e, apesar de nosso estudo não ter demonstrado haver relação com entre o BMI-1 e a sobrevida das pacientes, muitos estudos sugerem existir tal relação, porém os trabalhos publicados ainda não chegaram a um consenso sobre o papel do BMI-1 na sobrevida. Desta maneira, mais estudos acerca da importância do BMI-1 em prever a sobrevida dos pacientes também são necessários a fim de definir seu papel como possível fator prognóstico em tumores mamários.

6- CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho podemos concluir que:

1. BMI-1 encontra-se positivo em 66 (27,6%) dos 239 casos de carcinomas mamários estudados;
2. Existe forte relação entre a expressão do BMI-1 e os genes reguladores da recombinação homóloga BRCA1, H2AX, Top3 β e p53;
3. Existe relação entre a expressão imunoistoquímica do BMI-1 com o marcador de proliferação celular Ki-67 e com os receptores hormonais (estrógeno e progesterona).
4. Em carcinomas mamários, a expressão imunoistoquímica do BMI-1 não apresentou relação com os parâmetros clinicopatológicos estudados.
5. Não houve diferença estatística quando correlacionamos a expressão de BMI-1 com sobrevida livre da doença, sobrevida livre de metástases e sobrevida específica do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

Normalizado de acordo com o Sistema Vancouver

Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. International Committee of Medical Journal Editors. **JAMA** 1993;269:2282-6.

1. Brnzei D, Foiani M.(2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(4):297-308.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011. 118p.
3. Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.C. and Klevit, R.E. (2001) Structure of a BRCA1–BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat. Struct. Biol.* 8, 833–837.
4. Chen, A.,Kleiman, F. E., Manley, J. L., Ouchi, T. & Pan, Z. Q. (2002) Autoubiquitination of the BRCA1-BARD1 RING ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 277, 22085–22092.
5. Chicheportiche, A., Bernardino-Sgherri, J., de Massy, B. and Dutrillaux, B. (2007) Characterization of Spo11-dependent and independent phospho-H2AX foci during meiotic prophase I in the male mouse. *J. Cell Sci.* 120, 1733– 1742.
6. Choi, Y. J., Choi, Y. L., Cho, E. Y., Shin, Y. K., Sung, K. W., Hwang, Y. K., Lee, S. J., et al. (2009). Expression of Bmi-1 protein in tumor tissues is associated with favorable prognosis in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, 113(1), 83-93.
7. Cox DR. (1972) Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B.*; 34:187-220.
8. d’Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNADamage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522.
9. Daniel, R. et al. (2004) Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J. Biol. Chem.* 279, 45810–45814.
- 10.de Azambuja E, Cardoso F, de Castro GJ, Colozza M, Mano M, Durbecq V, et al. (2007) Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 96(10):1504-13.

11. Dhawan S, Tschen SI, Bhushan A (2009) Bmi-1 regulates the Ink4a/Arf locus to control pancreatic beta-cell proliferation. *Genes Dev* 23:906-911.
12. Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan CH, Ries F, Gobert PH, Closon-Dejardin MT, Dolci S, Rouas G, Paesmans M, Lobelle JP, Isola J, Piccart MJ (2001) HER-2 and topoisomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* 12:1081-1089.
13. Du, J., Li, Y., Li, J., & Zheng, J. (2010). Polycomb group protein Bmi1 expression in colon cancers predicts the survival. *Medical oncology* (Northwood, London, England), 27(4), 1273-6.
14. Dudenhöffer C, Rohaly G, Will K. (1998) Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol.* 18(9):5332-42.
15. Essers, J. et al. (2002) Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *EMBO J.* 21, 2030–2037.
16. Facchino S, Abdouh M, Chato W, Bernier G (2010) BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci* 30:10096-10111.
17. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ (2000) Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:966-978.
18. Ginjala V, Nacerddine K, Kulkarni A, Oza J, Hill SJ, Yao M, Citterio E, van Lohuizen M, Ganesan S (2011) BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol Cell Biol* 31:1972-1982.
19. Guirouilh-Barbat, J., Redon, C., Pommier, Y. (2008) Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11–Rad50–Nbs1 complex. *Mol. Biol. Cell* 19, 3969–3981.
20. Guo BH, Feng Y, Zhang R, Xu LH, Li MZ, Kung HF, Song LB, Zeng MS (2011) Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Mol Cancer* 10:10
21. Haaf, T. et al. (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2298–2302.

22. Huen MS, Sy SM, Chen J (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:138-148
23. Ismail, I.H., Wadhra, T.I., Hammarsten, O. (2007) An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res.* 35, e36.
24. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M (1999) The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397:164-168
25. Jasin M (2002) Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* 21:8981-8993
26. Jasin M. (2001). DNA Damage and Repair, Vol. III. Nickoloff JA & Hoekstra, M.F. (eds). Totowa, N.J.: Humana Press, pp. 207 – 235.
27. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. (2009) Cancer statistics,. *CA Cancer J Clin.* 2009 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
28. Joensuu K, Hagström J, Leidenius M, Haglund C, Andersson LC, Sariola H, Heikkilä P (2011) Bmi-1, c-myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases--elevated Bmi-1 expression in late breast cancer relapses. *Virchows Arch* 459:31-39
29. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91:649-659
30. Kim JH, Yoon SY, Jeong SH, Kim SY, Moon SK, Joo JH, Lee Y, Choe IS, Kim JW (2004) Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer. *Breast* 13:383-388
31. King MC, Marks JH, Mandell JB. (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 302:643–646.
32. Kwan K, Moens P, Wang J. (2003) Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5):2526-31.
33. Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T (2009) Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 459:387-392

34. Liu JH, Song LB, Zhang X, Guo BH, Feng Y, Li XX, Liao WT, Zeng MS, Huang KH (2008) Bmi-1 expression predicts prognosis for patients with gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 97:267-272
35. Mangia A, Chiriatti A, Tommasi S, Menolascina F, Petroni S, Zito FA, Simone G, Schittulli F, Paradiso A (2009) BRCA1 expression and molecular alterations in familial breast cancer. *Histol Histopathol* 24:69-76
36. Marti, T.M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V. and Cleaver, J.E. (2006) H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9891–9896.
37. Michel B, Grompone G, Flores M, Bidnenko V. (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(35):12783-8.
38. Miki, Y. et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66–71.
39. Mitra A, Jameson C, Barbachano Y, Sanchez L, Kote-Jarai Z, Peock S, Sodha N, Bancroft E, Fletcher A, Cooper C, Easton D, Eeles R, Foster CS, Collaborators ISCaE (2009) Overexpression of RAD51 occurs in aggressive prostatic cancer. *Histopathology* 55:696-704
40. Mohanty S, Town T, Yagi T, Scheidig C, Kwan KY, Allore HG, Flavell RA, Shaw AC (2008) Defective p53 engagement after the induction of DNA damage in cells deficient in topoisomerase 3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5063-5068
41. Morris J, Solomon E. (2004) BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet.*13(8):807-17.
42. Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H. e Jasin, M. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* 4, 511–518.
43. Ohta T, Sato K, Wu W. (2011) The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. *FEBS Letters* 585: 2836–2844.
44. Oka K, Tanaka T, Enoki T, Yoshimura K, Ohshima M, Kubo M, Murakami T, Gondou T, Minami Y, Takemoto Y, Harada E, Tsushimi T, Li TS, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Hamano K (2010) DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 9:246-252
45. Oliveira-Costa JP, Zanetti J, Oliveira LR, Soares FA, Ramalho LZ, Silva Ramalho F, Garcia SB, Ribeiro-Silva A (2010) Significance of topoisomerase

- III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. *Hum Pathol* 41:1624-1630
46. Pietersen, A. M., Horlings, H. M., Hauptmann, M., Langerød, A., Ajouaou, A., Cornelissen-Steijger, P., Wessels, L. F., et al. (2008). EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer. *Breast cancer research*, 10(6), R109.
 47. Polanowska J, Martin J, Garcia-Muse T, Petalcorin M, Boulton S. (2006) A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *EMBO J.* 25(10):2178-88.
 48. Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 6, 789–802.
 49. Ribeiro-Silva A, Garcia SB; Chahud F, Zucoloto S. (2005) Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41:197-203.
 50. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858- 5868.
 51. Sak A, Stuschke M (2010) Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 20:223-231
 52. Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. and Livingston, D.M. (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265–275.
 53. Sengupta S, Harris C. (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(1):44-55.
 54. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer Statistics: The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Volume 61, Issue 4, pages 212–236, July/August 2011.
 55. Silva, J., García, V., García, J. M., Peña, C., Domínguez, G., Díaz, R., Lorenzo, Y., et al. (2007). Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients. *Breast cancer research*, 9(4), R55.
 56. Soerjomataram I, Louwman M, Ribot J, Roukema J, Coebergh J. (2008) An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 107(3):309-30.

57. Song, W., Tao, K., Li, H., Jin, C., Song, Z., Li, J., Shi, H., et al. (2010). Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer science*, 101(7), 1754-60.
58. Sonoda, E. et al. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* 17, 598–608
59. Sy, S.M., Huen, M.S. and Chen, J. (2009) PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 7155–7160.
60. Takahashi, A. e Ohnishi, T. (2005) Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 229, 171–179.
61. Tarsounas, M. et al. (2004) RAD51 localization and activation following DNA damage. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 87–93.
62. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber R, Golouh R, Goldhirsch A, et al. (2003) Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer.* 97(5):1321-31.
63. Tsuzuki, T. et al. (1996) Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6236–6240.
64. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118:409-418
65. van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H, van der Valk M, Deschamps J, Sofroniew M, van Lohuizen M (1994) Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the Bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* 8:757-769
66. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206
67. Ward, I.M. and Chen, J. (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATRdependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276, 47759–47762.
68. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF, Pathologists ASoCOCO (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal

- growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 131:18-43
69. Wu, L.C. et al. (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat. Genet.* 14, 430–440.
 70. Xu, X. et al. (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell* 3, 389–395.
 71. Yang GF, He WP, Cai MY, He LR, Luo JH, Deng HX, Guan XY, Zeng MS, Zeng YX, Xie D (2010) Intensive expression of Bmi-1 is a new independent predictor of poor outcome in patients with ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 10:133
 72. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 11(2):174-83.
 73. Yuan, J., Ghosal, G., Chen, J. (2009) The annealing helicase HARP protects stalled replication forks. *Genes Dev.* 23, 2394–2399.
 74. Yuan, S.S. et al. (1999) BRCA2 is required for ionizing radiation induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* 59, 3547–3551. 10
Tarsounas, M. et al. (2003) BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 22, 1115–1123.
 75. Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B. and Yu, X. (2009) PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.* 19, 524–529.
 76. Zhao, GY, Sonoda E, Barber LJ, et al. (2007) A critical role for the ubiquitin conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol. Cell* 25, 663–675.