Stana Helena Giorgi Grosso

Avaliação da mudança na expressão gênica em tumores de
mama após tratamento com rapamicina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Oncologia
Orientador: Profª Drª Maria Mitzi Brentani

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Grosso, Stana Helena Giorgi

Avaliação da mudança na expressão gênica em tumores de mama após
tratamento com rapamicina / Stana Helena Giorgi Grosso. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Radiologia

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Maria Mitzi Brentani

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Sirolimo 3.Expressão gênica 4.Marcadores
biológicos 5.Técnicas de cultura de órgãos 6.Análise em microsséries

USP/FM/SBD-273/08

Dedicatória

Ao meu marido Sérgio Grosso,

O meu amor e admiração aumentam a cada dia de nossa convivência. Suas pequenas atitudes traduzem a pessoa tão especial que você é. Agradeço a Deus e me sinto privilegiada em poder compartilhar minha vida com você. Obrigado pelo amor, respeito, carinho e dedicação a mim e nosso filho e principalmente por nossa pequena "grande" família.

A meu filho, Gian Marco,

Não existem palavras que expressem o quanto você é amado por seus pais. Meu filho querido, você é o maior presente que Deus nos deu...

"O seu sorriso me fez uma pessoa melhor".

Aos meus pais, Conceição e Stoyan por todo amor, dedicação e ensinamentos. Meus pais, vocês são verdadeiros exemplos de honestidade, dignidade, respeito, amor e perseverança, a quem sou muito grata.

A minha irmã, Claudia e meus queridos sobrinhos, Luis Eugênio e Matheus, por sempre compartilharem e estarem presentes em todos os momentos de minha vida, pelo carinho, apoio e incentivo.

Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço a Prof^a Dr^a Maria Mitzi Brentani por toda paciência, dedicação e principalmente pelo amor em transmitir seus imensuráveis conhecimentos. Ser sua aluna foi uma honra. Agradeço de todo coração a oportunidade e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos colegas de trabalho e amigos do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, pelo apoio, estímulo e incentivo durante esta jornada.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pela ajuda na supervisão e revisão dos exames anátomo-patológicos.

A Suely Nonagaki, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio no estudo imunoistoquímico.

A senhora Rosimeire Aparecida Rocha pela ajuda nas análises de Microarray e pela enorme colaboração a este trabalho.

A senhora Maria Lúcia Hirata Katayama pela ajuda e ensinamentos na realização das culturas de tecidos e nas análises de Microarray.

A Adriana Priscila Trapê pela ajuda na elaboração das análises de RP-PCR.

A senhora Maria José Gonçalves e Ivanete Borges Viana por toda paciência, carinho e amizade .

Ao amigo Eduardo Carneiro de Lyra pelo carinho, amizade e grande incentivo na realização deste trabalho.

A amiga Cíntia Flores pela grande ajuda na coleta dos materiais utilizados neste estudo e pela disponibilidade, apoio e incentivo.

A Sra Maria Reis Santiago, pelo amor e carinho que cuida do meu lar e do meu filho na minha ausência.

A FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

A Sra Márcia e Maridalva, funcionárias da biblioteca da FMUSP, pela grande ajuda na procura de artigos científicos e na elaboração da ficha catalográfica.

Enfim, meu agradecimento a todos que de algum modo colaboraram com a elaboração deste trabalho.

Sumário

Sumário

Resumo	
Summary	
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Lista de quadros	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Mecanismo de ativação do PI3K	4
1.2 Rapamicina	19
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Processamento das amostras para cultura de tecido	31
3.2 Estudo imunoistoquímico.....	35
3.3 Protocolos de reações imunoistoquímicas	36
3.4 Escores utilizados	38
3.5 Extração de RNA total	39
3.6 Transição Reserva (RT).....	40
3.7 Avaliação do perfil gênico por cDNA microarray	41
3.7.1 Protocolo de ensaio de cDNA “microarray”	41
3.8 PCR em tempo real	42
3.9 Método para análise estatística	46
4 RESULTADOS	48
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÃO.....	93
7 BIBLIOGRAFIA	96

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

µg	Micrograma
µm	Micrometro
µl	Microlitro
4EBP1	Fator de Iniciação Eucariótico 4E Ligante de Proteína 1
5'-TOP	Terminal Oligopirimidina 5'
5'-UTR	Terminal Não Traduzido 5'
AKT	Proteína Serina Treonina Quinase B
AMPK	Proteína Quinase Ativadora de Adenosina Monofosfato
CDK	Quinases Dependentes de Ciclina
BSA	Albumina Bovina
cDNA	DNA complementar
cRNA	RNA complementar
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CDIS	Carcinoma Intraductal
Complexo TSC1/TSC2	Complexo Hamartina / Tuberina
COOH	Carboxila
DAB	Tetrahydrocloroeto de Diaminobenzedina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	"Dubelcco's Modified Eagle Médium"
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
eIF4A	Fator de Iniciação Eucariótico 4 ^a
eIF4B	Fator de Iniciação Eucariótico 4B

eIF4E	Fator de Iniciação Eucariótico 4E
eIF4G	Fator de Iniciação Eucariótico 4G
eNOS	Sintase Endotelial do Oxido Nítrico
ER	Receptor de Estrógeno
ErbB-2	Receptor de Fator de Crescimento Tipo 2
ErbB- 3	Receptor de Fator de Crescimento Tipo 3
ESTs	“Expression Sequence Tags”
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	“Food and Drug Administration”
FK506	Tacrolimus
FKBP12	“FK506-Binding Protein-12”
FRAP	“FKBP12-Rapamycin-Associated Protein”
GAP	Proteína Ativadora de GTPase
GF	Fator de Crescimento
GPCR	Receptor Acoplado à Proteína G
GβL	“G proteinβ-subunit-like protein”
HB-EGF	Ligante de Heparina do Fator de Crescimento Epidermal
HE	Hematoxilina-Eosina
HEAT	“Huntingtin, EF3, A Subunit of PP2A, TOR1”
HIF-1α	Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia
hTERT	Telomerase Humana Transcriptase Reversa
IGFR	Receptor de Fator de Crescimento de Insulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUAC	“International Union Against Cancer”

Kda	Quilodalton
LKB1	Serina Treonina Quinase 11
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
Mdm2	“Murine Double Minute -2”
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Matriz de Metaloproteínas
mTOR	“Mammalian Target of Rapamycin”
NF-KB	“Factor Nuclear-Kappa B”
Ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
pB	Pares de Base
p 110	Subunidade Catalítica de PI3K
p 85	Subunidade Adaptadora / Regulatória de PI3K
p21	Oncogene p21
p27	Oncogene p27
p53	Oncogene p53
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PDK1	Proteína Quinase 1 Dependente de Fosfoinosítido -3
PDK2	Proteína Quinase 2 Dependente de Fosfoinosítido
PH	Homologia à Pleckstrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5 –Bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato
PKB	Proteína Quinase B

PKC	Proteína Quinase C
PR	Receptor de Progesterona
pRb	Proteína Retinoblastoma
PTEN	Fosfatase e Tensina Deletada Homóloga ao Cromossomo 10
RAFT	“Rapamycin and FKBP12 Target”
RAPT	“Rapamycin Target”
Rheb	“Ras Homolog Enriched in Brain”
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RNA _t	Ácido Ribonucléico Transportador
RNA _r	Ácido Ribonucléico Ribossômico
RPMI	Meio de Cultura Roswell Park Memorial Institute
RTK	Receptor Tirocino-Quinase
RT-PCR	Reação de Cadeia Polimerase – Transcriptase Reversa
S6K1	Quinase Ribossomal S6
SEP	“Sirolimus Effector Protein”
Ser 473	Serina 473
SH2	Domínio 2 de Homologia Src
SIM	Moléculas de Interação de Sinais
SSC	Tampão Cloreto de Sódio-Citrato de Sódio
Thr 308	Treonina 308
TNM	T=Tumor; N=Comprometimento de Linfonodos Axilares; M=Metástase
TOR	Alvo da Rapamicina
TSC1	Hamartina
TSC2	Tuberina
UTP	Uridina Trifosfato

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características clínico-patológicas de todos as pacientes participantes do estudo.	44
Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica.	36
Tabela 3 - Oligonucleotídeos usados para reação de RT- PCR	43
Tabela 4 – Características clínico-patológicas dos tumores de mama estudados	48
Tabela 5 – Resultados imunoistoquímicos dos elementos da via do AKT	50
Tabela 6 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunoistoquímica p-AKT (Thr).....	53
Tabela 7 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunoistoquímica p-AKT (Ser).....	54
Tabela 8 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunoistoquímica p-mTOR	54
Tabela 9 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunoistoquímica p-S6K1	54

Tabela 10 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p- 4EBP1	54
Tabela 11 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-eIF4G	55
Tabela 12 – Relação do p-AKT (Thr 308) com fatores clínico- patológicos.....	58
Tabela 13 – Relação do p-AKT (Ser 473) com fatores clínico- patológicos.....	58
Tabela 14 – Relação do p-mTOR com fatores clínico- patológicos.....	59
Tabela 15 – Relação do p-S6K1 com fatores clínico- patológicos.....	59
Tabela 16 – Relação do p-4EBP1 com fatores clínico- patológicos.....	60
Tabela 17 – Relação do p-eIF4G com fatores clínico- patológicos.....	60
Tabela 18 – Classes funcionais dos genes afetados pela rapamicina	66

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura das três isoformas de AKT/PKB humanos	5
Figura 2 - Modelo de regulação da via PI3K/AKT	6
Figura 3 - Modelo de regulação da via mTOR.....	8
Figura 4 - Representação estrutural dos dois complexos mTOR: mTOR-Raptor (mTORC1) e mTOR-Rictor (mTORC2).	11
Figura 5 - Esquema representando o mecanismo de “feed-back” entre mTOR-Raptor e mTOR-Rictor.....	12
Figura 6 - A rapamicina inibe a fosforilação de 4EBP1, impedindo a liberação de eIF4E e consequentemente inibindo a formação do complexo eIF4F e a iniciação da tradução.....	13
Figura 7 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/AKT	15
Figura 8 - Esquema demonstrando o papel do ErbB-3 na via do PI3K/AKT	17
Figura 9 - Mecanismo de ativação de ER pela via do AKT	19
Figura 10 - Representação da estrutura química da rapamicina e do seu análogo, CCI-779.....	23
Figura 11 - Técnica de coleta e processamento das fatias e cultura dos tecidos tumorais.....	34

<p>Figura 12 - A) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-4EBP1 (100x). B) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão após tratamento com rapamicina (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-4EBP1 (100x)</p>	61
<p>Figura 13 - A) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-S6K1 (100x). B) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão após tratamento com rapamicina (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-S6K1 (100x).....</p>	62
<p>Figura 14 - Fotomicrografia de tumor de mama representando o tecido coletado a zero hora. Expressão imunoistoquímica do p-AKT(Thr) (100x).</p>	63

Lista de Gráficos

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Relação da diminuição de p-AKT (Ser 473) nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina	55
Gráfico 2 – Relação da diminuição de p-AKT (Thr 308) nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina	56
Gráfico 3 – Relação da diminuição de p-S6K1 nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina	56
Gráfico 4 – Relação da diminuição de p-4EBP1 nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina	57
Gráfico 5 – Relação dos genes diferencialmente expressos no grupo de tumores Erb-B2 negativo	65
Gráfico 6 – Relação dos genes diferencialmente expressos no grupo de tumores Erb-B2 positivo	65
Gráfico 7 – Gene EXT1 avaliado através de RT-PCR em amostras individuais	69
Gráfico 8 – Gene WWOX avaliado através de RT-PCR em amostras individuais	70
Gráfico 9 – Gene GTF2E2 avaliado através de RT-PCR em amostras individuais	70

Lista de Quadros

Lista de Quadros

Quadro 1 – Resumo dos estudos clínicos de Fase I, Fase II e Fase III, realizados com análogos de rapamicina	24
Quadro 2 – Estudos realizados entre 2001 e 2007 que estudaram a via AKT/mTOR e os inibidores do mTOR em linhagens celulares ou outros modelos de estudo	73
Quadro 3 – Origens das linhagens celulares de câncer de mama mais citadas nas publicações de acordo com a PubMed de 1° de janeiro de 1990 à 31 de dezembro de 2002	75

Resumo

Grosso, S.H.G. Avaliação na mudança da expressão gênica em tumores de mama tratados com rapamicina. São Paulo, 2008. 146p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A via AKT/PI3K apresenta-se geralmente alterada nos diversos tipos de cânceres humanos e a alteração dos componentes desta via ocorre através da ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais levando a transformações celulares que podem promover a tumorigênese. No câncer de mama a via AKT/PI3K pode ser ativada por Erb-B2, receptores dos fatores de crescimento de insulina (IGF), receptores de estrógeno e perda da expressão do gene PTEN. mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) é uma serina treonina quinase, membro da via AKT/PI3K que se encontra envolvida em múltiplas funções biológicas como controle da tradução, transcrição, degradação protéica e biogênese ribossomal. A ativação desta proteína resulta na fosforilação e ativação de seus principais substratos 4EBP1 e S6K1, requeridos para a biossíntese ribossomal e tradução de RNAs importantes para controle e progressão no ciclo celular. A rapamicina é uma droga com propriedades fungicidas, imunossupressoras e anticancerígenas que atua na inibição de mTOR afetando a expressão de genes envolvidos no metabolismo e síntese protéica.

No nosso estudo avaliamos os elementos da via do AKT através de análise imunoistoquímica em fatias de tumores mantidos em cultura de órgão antes e depois do tratamento com rapamicina. A cultura de órgão mantém uma interação entre o epitélio mamário e estroma podendo-se preservar o micro-ambiente que reconstitui o comportamento da célula tumoral. Nesta análise imunoistoquímica observamos uma diminuição significativa de 4EBP1 nas fatias dos tumores tratados com rapamicina em relação aos casos controles. Além disso, fizemos uma avaliação da mudança no perfil da expressão gênica nestas fatias tumorais sub-divididas em Erb-B2 positivos e negativos através da análise por “microarray” e observamos que a maioria dos genes afetados estavam envolvidos com as funções de transcrição e tradução celulares. Para confirmarmos os resultados obtidos por microarray fizemos uma análise por RT-PCR dos genes WWOX, EXT1 e GTF2E2 em amostras independentes e escolhidos aleatoriamente, conseguindo validá-los em 60% dos casos.

Conclusão: A cultura de órgão representa um método simples para determinação dos efeitos da rapamicina. Utilizamos uma estratégia de análise do perfil gênico e novas proteínas que poderiam servir como possíveis marcadores de resposta aos inibidores da proteína mTOR foram identificadas .

Summary

Grosso, S.H.G. Rapamycin induced transcriptional profile of breast cancer maintained in organ culture. São Paulo, 2008. 146p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

The AKT/ PI3K pathway are frequently disturbed in many human cancers and the alteration of the components of this pathway occurs through activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressors leading to cellular transformation that can promote tumorigenesis. In breast cancer the AKT/PI3K pathway can be activated by ERb-B2, the insulin like growth factor (IGF), estrogen receptors and PTEN loss. mTOR (mammalian target of rapamycin) is a serine threonine kinase, member of the AKT/PI3K pathway, which is involved in multiple biologic functions such as transcription, translation, protein degradation and ribosome biogenesis. The activation of this protein results in phosphorylation and activation of S6K1 and 4EBP1, two downstream signaling elements that are required for ribosomal biosynthesis and mRNAs translation, which is important for cell cycle control and progression. Rapamycin is a potent fungicide, immunosuppressive and anti-cancer agent that inhibits mTOR affecting the expression of genes involved in metabolism and protein synthesis.

In the present study we examined some elements of AKT pathway by immunohistochemistry analysis in samples of breast cancer maintained in organ culture before and after treatment with rapamycin. The organ culture maintain an interaction between the mammary epithelium and stroma preserving the micro-environment and restoring the tumor cell behavior. In this immunohistochemistry analysis we noticed a significative decrease of 4EBP1 in the samples of tumors treated with rapamycin compared with the control cases. Besides this, we determined the variation of gene expression profile through microarray analysis in these samples subdivided in positive and negative Erb-B2 and we have identified that most part of the affected genes were mainly involved in cellular transcription and translation. To confirm the results obtained through microarray technique, we have performed the RT-PCR analysis of WWOX, EXT1, GTF2E2 genes and we were able to validate them in 60% of our cases.

Conclusion: The organ culture represents a simple method to determine the effects of rapamycin. Using a strategic analysis of the gene profile, new proteins that possibly could be used as markers to the mTOR inhibitors were identified.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres, sendo estimado 49.400 casos novos para o ano de 2008. A distribuição dos casos novos segundo sua localização primária é bem heterogênea entre estados e capitais do país: as regiões sul e sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões norte e nordeste as taxas mais baixas e a centro – oeste, padrão intermediário (Ministério da Saúde – INCA, 2008).

A incidência por câncer de mama feminino tem apresentado crescimento nos últimos anos, o que pode ser resultado de mudanças sócio-econômicas e demográficas ou maior acessibilidade aos serviços de saúde. O aumento de risco pode estar também associado a fatores como: uso de pílulas anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal, obesidade na pós-menopausa e exposição a radiações ionizantes (Nkondjock and Ghadirian, 2005).

O câncer de mama continua sendo a maior causa de morte em mulheres, apesar das campanhas de prevenção, diagnóstico precoce, avanços no tratamento e um melhor entendimento da patogênese molecular (Fucito et al., 2008).

Os tumores humanos são caracterizados pela sua grande heterogeneidade e variabilidade histopatológica. No câncer de mama existe um processo progressivo da hiperplasia maligna para carcinoma in situ, carcinoma invasivo e metastático, isto ocorre concomitantemente ao ganho

de atividades oncogênicas e perda de funções de genes supressores tumorais. Os clássicos critérios de classificação tumoral como: tamanho do tumor, comprometimento axilar e disseminação metástática são geralmente os mais importantes fatores prognósticos em câncer de mama, no entanto as alterações moleculares, também devem ser consideradas (Beckmann et al., 1997).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2000) existem seis alterações na fisiologia celular que induzem às transformações celulares malignas: evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, insensibilidade à inibição de fatores de crescimento, angiogênese contínua, mecanismos de invasão e metástase celular e auto-suficiência dos fatores de crescimento. Em todos estes mecanismos as proteíno-quinases quando aberrantemente ativadas desempenham importante papel (Dillon et al., 2007).

Proteíno-quinases pertencem a uma grande família de enzimas que quando fosforiladas permitem que as células eucarióticas respondam aos estímulos externos (Hanks et al., 1988), desempenhando importantes funções na regulação do ciclo celular, metabolismo, motilidade celular, resposta ao microambiente, reparo ao dano do DNA e apoptose (Dancey et al., 2003). As proteíno-quinases são comumente ativadas em células cancerosas, onde promovem proliferação celular contribuindo para a tumorigênese. Diversos estudos estão em desenvolvimento para esclarecer os mecanismos de ação destas enzimas, principalmente após o sucesso do STI 571 (Imatinib Mesylate; Gleevec, Novartis), que é um inibidor de tirosino quinase comprovadamente efetivo para o tratamento da leucemia mielóide

crônica. Desde esta descoberta diversos inibidores de tirosino quinases estão sendo desenvolvidos e estudados (Melo et al., 2004).

O conhecimento dessas proteíno-quinases e suas vias de sinalização em câncer de mama, assim como alterações genéticas ocorridas nestas vias podem adicionar informações importantes para fins prognósticos e terapêuticos (Hennesy et al., 2005).

A via PI3K/AKT/mTOR está freqüentemente alterada em diversos tipos de cânceres humanos desempenhando importante papel, não somente no desenvolvimento de tumores malignos, como também por se constituírem alvos de resposta de determinados tumores à terapêutica empregada (Fresno Vara et al., 2004; Hennesy et al., 2005).

PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase) pertencem a uma família de quinases lipídicas que fosforilam o anel de inositol do grupo 3'-OH em fosfolipídeos de inositol (fosfoinositídeos) para gerar o PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). Os membros da família PI3K são agrupados em três classes (I, II e III). A classe I desempenha importante papel no controle da replicação celular, migração, sobrevivência e homeostase da glicose. São heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica (p 110), a qual possuem três isoformas denominadas: α , β e γ e uma subunidade adaptadora / regulatória (p 85). Esta classe é dividida em subclasse IA, ativada por receptores de tirosino-quinase (RTK) e IB, ativada por receptores acoplados à proteína G (GPCR) (Engelman et al., 2006).

1.1 Mecanismo de ativação do PI3K

A interação dos RTK com os fatores de crescimento resultam na ativação da proteína PI3K e conseqüente produção de PIP3 e PIP2 (fosfotidilinositol-4,5 bifosfato) no lado interno da membrana plasmática. PI3K se liga aos receptores de tirosino quinase através de seus dois domínios que possuem homologia à Src (SH2) localizados na subunidade adaptadora, a qual produzirá uma ativação alostérica na subunidade catalítica. Uma vez ativada, PI3K, converte PIP2 em PIP3 em poucos segundos recrutando proteínas que contenham homologia à pleckistrina (PH) no lado interno da membrana, como AKT e PDK1 (proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo-3) permitindo a ligação dessas proteínas à membrana plasmática através de interações fosfolipídicas (Kang et al., 2005).

O gene PTEN (fosfatase e tensina deletada homóloga ao cromossomo 10) é uma fosfatase com atividades lipídicas e protéicas, identificado inicialmente como supressor tumoral. O seu principal substrato lipídico é o PIP3, que é um dos produtos do PI3K e atua desfosforilando o PIP3 em PIP2 (Cully et al., 2006).

PKB/AKT é uma serina treonina quinase com 57 Kda caracterizada pelo isolamento de dois genes denominados AKT1 e AKT2, identificados como homólogos humanos para o oncogene viral v-AKT, o qual é identificado como o responsável por um tipo de leucemia em ratos (Staal et al., 1987). Estudos revelaram que o v-AKT e seus homólogos humanos codificam uma

proteína quinase semelhante a proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA), denominada de PKB (Bellacosa et al., 1991; Jones et al., 1991). Podemos descrever três membros da família PKB: PKB α (AKT1), PKB β (AKT2), PKB γ (AKT3). Em humanos o AKT1, AKT2 e o AKT3 estão localizados respectivamente nos cromossomos 14q32, 19q13 e 1q44; sendo identificados através da técnica de hibridização “in situ” (Staal et al., 1988). Embora sejam produtos de diferentes genes, possuem mais de 80% de homologia entre seus aminoácidos. AKT2 e AKT3 possuem 81 e 83% de homologia com o AKT1, respectivamente (Vanhaesebroeck et al., 2000).

Cada gene codifica uma proteína contendo um domínio PH na porção N-terminal, um domínio quinase central e um domínio regulatório no terminal carboxila que possui afinidade por moléculas hidrofóbicas (Osaki et al., 2004; Bhaskar e Hay, 2007).

Figura 1 - Estrutura das três isoformas de AKT/PKB humanos.

Cada isoforma consiste de três domínios funcionais: terminal-N, que se liga aos fosfolipídeos inositóis; domínio central quinase, Thr 308 (Thr 309 no AKT3) e um domínio regulatório terminal-C, Ser 473 (Ser474 no AKT2, Ser472 no AKT3) (modificado de Osaki et al., 2004).

A interação do domínio PH do AKT com o PIP3 provocará alterações conformacionais em sua molécula, resultando na exposição de seus dois principais sítios de fosforilação (Thr 308 no domínio quinase e Ser 473 no domínio regulatório terminal C). A fosforilação na Thr 308 é feita por PDK1 e da Ser 473 por mTOR-Rictor que possui função de PDK2 (proteína quinase 2 dependente de fosfoinosítídeo), que é uma quinase com propriedade hidrofóbica. A fosforilação dos dois sítios são essenciais para a ativação completa do AKT (Sarbasov et al., 2004; Jacinto et al., 2006). As mutações do gene Ras também podem ativar a via do AKT, através da ativação da subunidade p110 do PI3K (Osaki et al., 2004; Faivre et al., 2006).

Figura 2 - Modelo de regulação da via PI3K/AKT.

A ligação de fatores de crescimento com RTK ou GPCR estimula a fosforilação de PI3K que converte PIP2 em PIP3, sendo que PTEN pode reverter esta reação. AKT migra em direção à membrana celular interagindo com PIP3 através do domínio PH, sendo fosforilado em dois resíduos (Thr 308 e Ser 473) através de PDK1 e PDK2 (mTOR-Rictor) (modificado de Osaki et al., 2004).

O AKT ativado tem múltiplos substratos, sendo que o complexo TSC1/TSC2 está diretamente envolvido na regulação do mTOR. TSC2 (Tuberina), quando não fosforilada forma com TSC1 (Hamartina), um complexo que regula mTOR negativamente. O complexo TSC1/TSC2 possui atividade de GTPase (GAP), convertendo a forma ativa GTP-Rheb (Ras homolog enriched in brain) em sua forma inativa GDB-Rheb. O TSC2 possui homologia às proteínas ativadoras de GTPase e sua heterodimerização com TSC1 é requerida para que exerça atividade sua GAP em relação a GTPase- Rheb (Inoki et al., 2003).

Quando TSC2 se encontra fosforilado, AKT inibe a atividade GAP do complexo TSC1/TSC2, permitindo que o GTP-Rheb se ligue ao domínio quinase do mTOR-Raptor, permitindo sua ativação. Rheb é requerida para ativação do mTOR-Raptor. Essa ligação provoca alterações conformacionais no complexo mTOR-Raptor promovendo sua ativação (Long et al., 2005).

Em situações de baixa energia, LKB1 que é uma serina treonina quinase fosforila e ativa a proteína AMPK (proteína-quinase ativadora de adenosina monofosfato), a qual funciona como um sensor de energia nas células eucarióticas, levando a fosforilação de TSC2 aumentando a habilidade do complexo TSC1/TSC2 em inibir mTOR (Inoki et al., 2003).

Portanto, os maiores reguladores da atividade do mTOR são PI3K/AKT e LKB1/AMPK, no entanto, ambos se relacionam com o complexo TSC1/TSC2 atuando de modo diverso. A fosforilação de TSC2 pelo AKT bloqueia a capacidade do complexo em interferir na atividade Rheb, estimulando mTOR e ao contrário, a fosforilação de TSC2 por AMPK reforça

a atividade GAP em relação a Rheb, bloqueando a ativação da proteína mTOR (Hynes e Boulay, 2006).

Figura 3 - Modelo de regulação da via mTOR.

A via mTOR pode ser iniciada por estímulos vindos de PI3K e AMPK. Após o estímulo, RTKs ativam PI3K e AKT fosforilando TSC2, inibindo a atividade GAP do Complexo TSC1/TSC2 e consequentemente ativando mTOR-Raptor. AMPK fosforila TSC2, não permitindo que o Complexo TSC1/TSC2 exerça sua atividade GTPase-Rheb e consequentemente inibindo mTOR. Os sinais vermelhos indicam as mutações desta via que levam ao câncer (PI3K, AKT, Rheb e S6K1). Os sinais azuis indicam proteínas sub-expressas nas células do câncer (PTEN, Complexo TSC1/TSC2, LKB1) (modificado de Hynes e Boulay, 2006).

Para que ocorra crescimento e progressão no ciclo celular são necessários nutrientes e fatores de crescimento. Caso a taxa de crescimento não seja suficiente para manter a divisão celular, ocorrerá uma diminuição da proliferação celular, levando a uma perda de massa e tamanho

resultando em morte celular. A proteína alvo da rapamicina (TOR - Target of Rapamycin) se encontra localizada no citoplasma das células regulando o crescimento e progressão no ciclo celular através de sua capacidade em responder a fatores nutricionais (aminoácidos e energia), fatores de crescimento e percepção ao meio ambiente. Um dos mais potentes ativadores da proteína mTOR são os nutrientes, particularmente aminoácidos, pois em presença de fatores de crescimento e nutrientes, esta proteína se encontra constitutivamente ativada (Castedo et al., 2002; Fingar e Blenis, 2004).

mTOR funciona como um supressor endógeno da autofagia, ativando-a em situações de diminuição de nutrientes, que inibe a sua função, permitindo que as células produzam energia e inibindo-a em presença de nutrientes (Faivre et al., 2006). Em células suficientemente nutridas, produzirá um sinal levando a um aumento da tradução de RNAs que codificam proteínas essenciais para o crescimento e conseqüentemente progressão no ciclo celular (Blommaart et al., 1995; Shigemitsu et al., 1999; Bjornsti e Houghton, 2004).

Nos mamíferos, esta proteína é denominada mTOR, sendo também conhecida como FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein), RAFT (rapamycin and FKBP12 target), RAPT (rapamycin target) ou SEP (sirolimus effector protein) (Chiu et al., 1994; Brown et al., 1995; Sabatini et al., 1995; Sabers et al., 1995) e trata-se de uma serina treonina quinase com 289 Kda, que devido a grande homologia de seu terminal carboxila (COOH) ao domínio catalítico do PI3K, é considerada membro da família proteíno

quinase, estando envolvida em múltiplas funções celulares, tais como regulação da progressão do ciclo celular e pontos de checagem que governam respostas celulares envolvidas em danos, reparos e recombinações do DNA. As disfunções dos membros desta família resultam em patologias como câncer e imunodeficiência.(Gingras et al., 2001;Huang et al., 2003).

A estrutura da proteína TOR encontra-se preservada nas células desde leveduras a mamíferos, apresentando-se sob a forma de dois complexos: mTOR-Raptor (TORC1) e mTOR-Rictor (TORC2). mTOR-Raptor é sensível a rapamicina e ativado por nutrientes, fatores de crescimento, hormônios e energia, sendo composto por mTOR, Raptor e mLST8. É o principal regulador da biogênese ribossomal e síntese protéica, mantendo essas funções de leveduras à mamíferos (Inoki e Guan, 2006; Wullschleger et al., 2006).

A proteína mTOR-Rictor é insensível a rapamicina e composto por mTOR, Rictor e mLST8, sendo responsável nas leveduras e mamíferos pela regulação da actina do citoesqueleto. Esta proteína é ativada por diversos fatores de crescimento possuindo função de PDK2 (Sarbasov et al., 2005;Jacinto et al., 2006). A proteína mTOR é necessária para o funcionamento destes dois complexos, gerando uma competição entre eles (Hay, 2005).

Figura 4 - Representação estrutural dos dois complexos mTOR: mTOR-Raptor (mTORC1) e mTOR-Rictor (mTORC2) (modificado de Bhaskar e Hay, 2007).

Estruturalmente mTOR é composto pelo componente HEAT (Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A, TOR1) localizado no terminal amina, responsável pela ligação interprotéica; pelo domínio catalítico, localizado na metade do terminal carboxila e pelo FRB (FKBP12-Rapamycin Binding). A rapamicina se liga ao domínio FRB, inibindo sua atividade. No terminal carboxila temos os domínios FAT e o FATC, importantes para a atividade quinase da proteína TOR e a deleção de um único aminoácido destes domínios podem inibir sua atividade (Peterson et al., 2000; Takahashi et al., 2000).

O equilíbrio entre o mTOR-Raptor e o mTOR-Rictor atua como um mecanismo de “feed-back” para a inibição de AKT por mTOR, ou seja, quando o complexo mTOR-Raptor é formado, ocorre a diminuição da formação de mTOR-Rictor, portanto, a redução da atividade de AKT. Quando o complexo TSC1/TSC2 está deficiente, a proteína mTOR-Raptor se encontra constitutivamente ativada, reduzindo a atividade da proteína mTOR-Rictor e consequentemente, a ativação de AKT. O complexo mTOR-Rictor ativa AKT impedindo que o complexo TSC1/TSC2 ative Rheb, provocando a ativação do complexo mTOR-Raptor (Zhang et al., 2003; Harrington et al., 2005). Em células com deficiência de PTEN e do complexo TSC1/TSC2, PI3K está hiperativado levando a uma hiperativação do

complexo mTOR-Rictor restaurando, portanto a atividade de AKT e mTOR-Raptor (Hay, 2005).

Figura 5 - Esquema representando o mecanismo de “feed-back” entre mTOR-Raptor e mTOR-Rictor.

A) RTK ativa PI3K ativando AKT que induz a translocação de PDK1 para membrana plasmática, permitindo sua fosforilação por PDK1 na T308 e PDK2 (mTOR-Rictor) na Ser473, levando à sua ativação completa. B) AKT ativado, produz ativação da proteína mTOR-Raptor inibindo mTOR-Rictor e consequentemente inibindo AKT. Em células com deficiência do complexo TSC1/TSC2, mTOR-Raptor está constitutivamente ativado, reduzindo a atividade da proteína mTOR-Rictor e AKT. C) Nas células com deficiência de PTEN e complexo TSC1/TSC2, o PI3K está superativado, levando a uma superativação do mTOR-Rictor restaurando a atividade do AKT (modificado de Hay, 2005).

O complexo mTOR-Raptor regula a biogênese e síntese proteica através de seus dois substratos, 4EBP1 e S6K1. O bloqueio de mTOR provocará a inibição de seus substratos, inibindo a tradução de RNAs importantes na progressão do ciclo celular (Hay, 2005).

O 4EBP1 é uma proteína de pequeno peso molecular que inibe a iniciação da tradução através da sua associação com eIF4E. A ligação do 4EBP1 com o eIF4E depende do “status” de fosforilação do 4EBP1, ou seja, a hiperfosforilação do 4EBP1 libera o eIF4E resultando na sua ativação e ao contrário se o 4EBP1 se encontrar hipofosforilado, ele se ligará avidamente ao eIF4E, resultando na sua inativação e consequentemente na inibição da

iniciação da tradução protéica (Gingras et al., 2001). Sob condições de fatores proliferativos, tais como, fatores de crescimento, estímulos mitogênicos e hormonais, o eIF4E se dissocia do 4EBP1 e se liga ao eIF4G, eIF4A e eIF4B, formando o complexo eIF4F importante para a tradução protéica cap dependente. Esta cascata de eventos induz a um aumento de RNAs com elementos regulatórios no terminal não traduzido 5' (5'-UTR), incluindo RNAs que codificam c-myc e ciclina D1 (Rosenwald et al., 1995).

Figura 6 - A rapamicina inibe a fosforilação de 4EBP1, impedindo a liberação de eIF4E e consequentemente inibindo a formação do complexo eIF4F e a iniciação da tradução (modificado de Hidalgo e Rowinsky, 2000).

O S6K1 é um outro importante substrato da proteína mTOR. Quando ativado, mTOR fosforila S6K1 na Thr389, que irá fosforilar a proteína S6 através do recrutamento da sub-unidade ribossomal 40S, aumentando

portanto, a tradução de RNAs que contenham o terminal oligopirimidina (5'-TOP), ou seja, RNAs que codificam proteínas ribossomais, fatores de alongamento, fatores de iniciação e outros importantes componentes para a maquinaria da síntese protéica (Castedo et al., 2002). A inibição de mTOR leva a desfosforilação de S6K1 e 4EBP1 inibindo a tradução de RNAs específicos envolvidos no ciclo celular contribuindo a uma parada no ciclo celular (Mondesire et al., 2004). S6K1 também pode fosforilar as unidades eIF4G e eIF4B, unidades do complexo eIF4F. Foram identificados três sítios de fosforilação em S6K1 e todos podem ser bloqueados pelos inibidores do mTOR (Faivre et al., 2006).

Além da inibição de 4EBP1 e S6K1, os inibidores do mTOR produzem efeitos antiproliferativos através do bloqueio da progressão no ciclo celular. A inibição de 4EBP1 provoca a diminuição de ciclina D1 e consequentemente do complexo CDK4/ciclinaD1 que é importante para a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), além de impedir a liberação do p27 (inibidor do complexo CDK2/ciclinaE). Todos estes efeitos descritos em linhagens celulares, aliados a inibição da tradução de RNAs são os responsáveis pela parada no ciclo celular em G1, provocados pela rapamicina (Hashemolhosseini et al., 1998).

A desregulação da via do AKT desempenha um importante papel em diversos mecanismos relacionados ao câncer e a sua superexpressão permite que uma célula tumoral se torne ultra responsiva a determinados níveis de fatores de crescimento que normalmente não provocariam proliferação. O envolvimento do AKT na tumorigênese sugere que sua

ativação por si só, seja suficiente para o desenvolvimento do câncer. O AKT regula a sobrevivência celular através da fosforilação de diversos substratos que controlam a maquinaria apoptótica (Testa et al., 2001).

Figura 7 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/AKT.

As linhas representam a ativação ou inativação dos substratos pelo AKT, estando dispostos de acordo com os fatores biológicos que predisõem à tumorigênese propostos por Hanahan e Weinberg, 2000 (modificado de Dillon et al., 2007).

Abaixo descrevemos os inúmeros efeitos do AKT relacionados as seis alterações celulares propostas por Hanahan e Weinberg., 2000.

- Fosforila e inativa proteínas mediadoras da apoptose: BAD (que controla a liberação do citocromo c da mitocôndria) e caspase-9 (processada pelo citocromo c liberado pela mitocôndria através da pró-caspase) (Dillon et al., 2007).
- Ativa por fosforilação reguladores positivos da NF-KB, responsáveis pela regulação da expressão de genes anti-apoptóticos (Dillon et al., 2007).

- Aumenta a atividade da telomerase através da fosforilação da subunidade da telomerase humana transcriptase reversa (hTERT) (Dillon et al., 2007).
- Induz a expressão de genes como ciclina D1 que promovem a progressão no ciclo celular (Dillon et al., 2007).
- Inibe a atividade anti-proliferativa do p21 e p27 retendo-os no citoplasma (Dillon et al., 2007).
- Quando ativado por fatores de crescimento, AKT fosforila Mdm2 no citoplasma formando o complexo Mdm2/p53 que migrará para o núcleo e ao deixar o núcleo em direção ao citoplasma, o p53 é degradado através do processo de ubiquitinização (Mayo e Donner, 2001).
- Desempenha um importante papel na angiogênese ativando o eNOS (Sintase endotelial do óxido nítrico) que libera o NO (óxido nítrico), estimulando a vasodilatação e angiogênese e ativando o HIF-1 α (fator de transcrição induzido por hipóxia) (Faivre et al., 2006; Dillon et al., 2007).
- Atua no processo de invasão e metástase através da secreção de metaloproteínases responsáveis pela degradação da matriz extracelular (Dillon et al., 2007).

Em câncer de mama a via AKT/PI3K/mTOR pode ser ativada por diversos receptores de membrana (ErbB-2, receptor de IGF e receptor de estrogênio) (Carraway et al., 2004), assim como pela perda da função do gene supressor PTEN (Feilotter et al., 1999; Cully et al., 2006).

No câncer de mama a amplificação e a superexpressão do ErbB-2 ocorre em 25 a 30% dos tumores, conferindo uma maior agressividade

biológica e portanto, pior prognóstico (Slamon et al., 1987). O ErbB-3 desempenha um importante papel no processo de tumorigênese desempenhado pelo ErbB-2 (Naidu et al., 1998). O aumento de expressão do ErbB-3 aumenta a capacidade de ErbB-2 provocar tumorigênese, através da formação de heterodímeros que são potentes ativadores das vias de sinalizações envolvidas no crescimento celular, anti-apoptose e invasão (Olayioye et al., 2000). A via PI3K/AKT só pode ser ativada por ErbB-3, assim, EGFR ou ErbB-2 ativam ErbB-3 fosforilando seus seis resíduos de tirosina permitindo sua ligação com a subunidade regulatória do PI3K (p85), ativando a via do AKT (Hsieh e Moasser, 2007).

Figura 8 - Esquema demonstrando o papel do ErbB-3 na via do PI3K/AKT.

ErbB-3 ativa PI3K diretamente através de seus seis sítios. Quando fosforilados por EGFR ou ErbB-2, as seis fosfotirosinas do ErbB-3 ligam-se a subunidade regulatória do PI3K (p85), levando a ativação do AKT (modificado de Hsieh e Moasser, 2007).

O receptor de estrógeno (ER) é um importante marcador preditivo e prognóstico no câncer de mama e se encontra expresso em 60% destes tumores, sendo que 50% desenvolverão resistência ao tamoxifeno. O mecanismo que provoca essa resistência ainda é desconhecido, no entanto existem evidências que sugerem uma relação entre ER e fatores de crescimento tirosino quinases e suas vias de sinalizações (Schiff et al., 2005).

O ER localizado na membrana celular em contato com estrógeno pode ativar receptores de fatores de crescimento tirosino quinases como receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) ou ErbB-2 ativando suas cascatas através de sua associação com quinases como c-Src (Wong et al., 2002; Razandi et al., 2003). Esta interação levará a ativação de metaloproteínases (MMPs) que quebram e liberam o ligante de heparina de EGF (HB-EGF) estimulando o ErbB-2 e suas vias como MAPK (mitogen-activated protein kinase) e AKT, levando a fosforilação do ER e seus coativadores no núcleo celular (Campbell et al., 2001) e conseqüente potencialização do efeito da atividade genômica do ER. Este processo leva a um aumento da expressão de genes que codificam RTKs, fatores de crescimento (GF), e moléculas de interação de sinais (SIM) (Schiff et al., 2005). A superexpressão da atividade do AKT aumenta a resistência ao tamoxifeno e tratamento com inibidores do mTOR restaura a sensibilidade ao tamoxifeno em células de câncer de mama resistentes ao medicamento anti-estrogênico através da modulação da atividade transcricional do ER- α (deGranffenried et al., 2004; Mondesire et al., 2004; Chang et al., 2007).

Figura 9: Mecanismo de ativação de ER pela via do AKT

O ER localizado próximo a membrana plasmática se associa com o estrógeno que através de quinases como c-Src ativam metaloproteínases (MMPs), levando a quebra e liberação do ligante de heparina EGF(HB-EGF), estimulando ErbB-2 e vias como MAPK e AKT que fosforilam o receptor de estrógeno e seus coativadores no núcleo celular aumentando a expressão de genes que codificam RTKs, GF e SIM, aumentando IGFR e completando o ciclo entre as duas vias do ER (modificado de Schiff et al.,2005).

As mutações do PTEN são relativamente raras em câncer de mama (5%), no entanto a perda de heterozigose e promoção de metilação, levando a uma perda do PTEN, são mais comuns nestes tipos de tumores (30%) e a perda da sua atividade leva a uma permanente ativação desta via (Feilotter et al., 1999; Cully et al., 2006).

1.2 Rapamicina

A rapamicina foi descoberta durante um programa de triagem para drogas antibacterianas através de recursos naturais promovido pelo “Ayerst Research Laboratories”, onde foram coletadas diversas amostras de solo de diferentes localizações geográficas. Foram coletadas 73 amostras de solo

por membros de uma expedição canadense, para Rapa Nui, mais comumente conhecida como Ilha de Páscoa. Foi em Vai Atare, região de Rapa Nui, no início dos anos setenta, que foi coletado uma amostra de solo contendo a bactéria, *Streptomyces hygroscopicus*. O princípio ativo foi isolado do micélio do *Streptomyces* e após sua purificação foi obtido um material cristalino com atividade antifúngica, insolúvel em água e solúvel em soluções orgânicas. O antibiótico foi denominado rapamicina (etimologia: RAPA [Rapa Nui] - mycin), recebendo o nome genérico de Sirolimus e o nome comercial de Rapamune (Seghal et al.,1975; Vezina et al.,1975; Seghal, 2003).

Embora tenha sido isolada por sua potente ação antifúngica no início dos anos setenta, especialmente ativa contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, a rapamicina começou ser alvo de interesse após a descoberta de uma outra substância derivada do *Streptomyces*, o FK506, pelo laboratório Farmacêutico Fujisawa (Ibaraki,Japão). FK506 (tacrolimus) demonstrou possuir uma potência imunossupressora 100 vezes maior que a ciclosporina A e sua estrutura química era semelhante a rapamicina (Kino et al.,1987). Esta similaridade entre as duas drogas despertou interesse dos pesquisadores na rapamicina como uma promissora droga imunossupressora. Ambos se ligam a mesma imunofilina FKBP-12 (FK506 Binding Protein-12) e embora a família FKBP seja grande, existem evidências genéticas e bioquímicas de que a FKBP-12 seja a mais importante proteína de ligação da rapamicina (Dumont et al.,1990; Wiederrecht et al.,1992). Após vários estudos observou-se que a

rapamicina possui um efeito imunossupressor muito mais eficaz e potente que o FK506 (Morris et al., 1990) e nos anos noventa foi aprovada pelo FDA como um agente com atividade imunossupressora para uso em transplante renais (Trepanier et al., 1998).

A descoberta através de estudos experimentais do efeito antiproliferativo da rapamicina em tumores de pequenas células do pulmão (Seufferlein e Rozengurt, 1996), osteossarcoma (Ogawa et al., 1998), carcinoma pancreático (Grewe et al., 1999; Shah et al., 2001) e rabdomiossarcoma (Dilling et al., 1994), estendeu o seu uso para área cardíaca na prevenção de reestenose de cateteres cardíacos (Morris et al. 1990; Sousa et al., 2003; van der Hoeven et al., 2005).

A via mTOR foi descoberta por acaso através de estudos realizados na tentativa de se avaliar e conhecer melhor o mecanismo de ação da rapamicina em triagens genéticas em *Saccharomyces cerevisiae* (Fingar e Blenis, 2004). A rapamicina se une intracelularmente ao FKBP-12 (FK506-Binding Protein-12) e este complexo se liga ao domínio FRB da proteína mTOR, atuando como inibidor de sua via. A inibição da fosforilação desta proteína pela rapamicina bloqueia a ativação de S6K1 e 4EBP1, reduzindo a tradução de RNAs que codificam componentes essenciais na síntese protéica como: fatores de crescimento, oncoproteínas e reguladores do ciclo celular, levando as células a uma parada em G1, provocando um efeito antiproliferativo e induzindo a apoptose em diversos tipos de tumores (Sabers et al. 1995; Carraway et al., 2004; Fingar e Blennis, 2004).

O papel da proteína mTOR no controle da síntese protéica nos mamíferos está bem definido, sendo feitas diversas analogias entre as suas funções e composições de leveduras a mamíferos. Mutações do TOR em leveduras ou em leveduras tratadas com rapamicina provocavam mudanças na expressão gênica, alteração na permeabilidade aos aminoácidos, autofagia, organização do citoesqueleto de actina, além da inibição da síntese protéica, além disto, TOR controla uma série de genes ligados ao metabolismo e a biogênese ribossomal (Rohde et al., 2001; Crespo e Hall, 2002). A conservação destas funções primordiais do TOR em leveduras comparados aos mamíferos permitiu uma relação entre o controle da expressão gênica nas leveduras em relação aos mamíferos. Estudos em linhagens celulares de linfoma e linfócitos de murino tratados com rapamicina apresentaram alteração na expressão de genes relacionados a síntese e metabolismo quando comparados aos casos-controles. As mudanças na expressão gênica e os genes afetados indicam que a rapamicina induz a promoção do catabolismo de nutrientes para produção de energia. As funções biológicas nas quais ocorrem mudanças diferencialmente expressas são as mesmas quando comparadas linhagens celulares de duas espécies diferentes (Peng et al., 2002).

As propriedades farmacológicas desfavoráveis da rapamicina, particularmente a sua pobre solubilidade em água e instabilidade química fizeram com que pesquisadores da “Wyeth-Ayerst” e do Instituto Nacional do Câncer se unissem a fins de desenvolverem uma droga com características farmacológicas favoráveis para uso em estudos pré-clínicos. Foram então

desenvolvidos os análogos da rapamicina, CCI-779, RAD 001 e AP23573. Estes análogos demonstraram possuir atividade antiproliferativa idêntica a rapamicina (Gibbons et al., 2000; Hidalgo e Rowinsky, 2000; Mita et al., 2003).

Figura 10 - Representação da estrutura química da rapamicina e do seu análogo, CCI-779 (modificado de Mita et al., 2003).

O análogo da rapamicina, CCI-779, foi avaliado em estudos clínicos de fase I e II e os resultados preliminares da fase I demonstraram uma boa tolerabilidade à droga, no entanto não determinaram uma dosagem apropriada (Raymond et al., 2004). A atividade antitumoral da droga incentivaram os pesquisadores a iniciarem os estudos de fase II (Atkins et al., 2004; Chan et al., 2005). Atualmente estão em andamento os estudos de fase III à fim de serem testados a eficácia dos análogos da rapamicina isoladamente ou em conjunto com outros medicamentos (Hudes et al., 2006).

Quadro 1 - Resumo dos estudos clínicos de Fase I, Fase II e Fase III, realizados com análogos de rapamicina.					
MEDIÇÃO	ESTUDO CLÍNICO	DOSE E N° DE PACIENTES	TIPOS DE TUMORES	PRINCIPAIS RESULTADOS	AUTORES
CCI-779 (Temozolomida) Intravenoso ou formulação oral	Fase I	7,5- 220mg/m ² /semana N=24	Renal e mama	Demonstrou atividade antitumoral da droga, sem estabelecer dose máxima tolerada. Poderia ser eficaz no tratamento de câncer de mama e rim. Dose recomendada ≤ 220mg/m ² Toxicidade: mucosite e trombocitopenia	Raymond et al., 2004
	Fase I	0,75-19,1mg/m ² diário/5 dias/quinzenal N=24		Um caso de resposta parcial em tumores de pulmão não pequenas células. Dose máxima tolerada: 19,1mg/m ² . Toxicidade: mucosite e trombocitopenia	Hidalgo et al., 2000
	Fase II	25 x 75 x 250 mg/semana N=111	Renal	Taxa de Resposta - 7%	Atkins et al., 2004
	Fase II	75 x 250/semana N=109	Mama	Benefício clínico em 52 (49%) das pacientes e em um caso houve resposta completa	Chan et al., 2005
	Fase II	250mg/semana N=34	Linfoma	Taxa de Resposta - 38%	Witzig et al., 2005
	Fase II	250mg/semana N=16	Endométrio	Taxa de resposta - 31%	Oza et al., 2006
	Fase III	25mg/semana N=626	Renal	Maior sobrevida nos pacientes tratados com CCI-779 (10,9 meses) comparados com interferon-α (7,3 meses)	Hudes et al., 2006
RAD001 (Everolimus) formulação oral					
	Fase I	5-20mg/semana		Dose recomendada: 20mg/semana Toxicidade: trombocitopenia e gastrite	O'Donnell et al., 2003
	Fase I/II	Dose de 2,5-5,0 mg/dia + Imatinib 600mg/dia	Tumores Gastro- Intestinais	Dose recomendada: 2,5mg/dia Resposta parcial em 2 pacientes e estabilização do tumor em 8 pacientes	Von Oosterom et al., 2005
AP23573	Fase I	6,25-100mg/dia/ semanalmente	Sarcoma	Demonstrou atividade antitumoral	Mita et al., 2004
	Fase II	3-28mg/dia x 5 dias/semana /quinzenal e 12,5 mg/dia x 5 dias / quinzenal	Sarcomas avançados	Resposta objetiva em 4 pacientes e redução tumoral avaliado por PET em 8 pacientes.	Chawla et al., 2007

Fonte: Janus et al., 2005 e Faivre et al., 2006

Apesar da evidente atividade antitumoral dos inibidores do mTOR e dos resultados animadores obtidos com os estudos clínicos, os marcadores específicos de ação da rapamicina ainda não foram documentados em câncer de mama e por enquanto a compreensão dos mecanismos de ação desta droga deriva-se fundamentalmente de modelos experimentais, não se podendo identificar as pacientes que poderiam se beneficiar com os inibidores do mTOR (Yu et al., 2001; Hidalgo, 2004).

Peralba et al. (2003) foi um dos primeiros a propor a avaliação de S6K1 nas células PBMCs (células mononucleares de sangue periférico), a fim de se desenvolver um marcador farmacodinâmico do análogo de rapamicina para fins de uso prático em estudos clínicos. As células PBMCs são fáceis de se coletar nos pacientes envolvidos nos estudos clínicos e o S6K1 se encontra constitutivamente ativado nestas células, além disto estudos anteriores utilizaram estas células na avaliação do efeito farmacodinâmico da rapamicina na prevenção da rejeição de pacientes transplantados (Yatscoff e Aspeslet, 1998). Boulay et al. (2004) descreveram o uso do S6K1 fosforilado como marcador molecular dos inibidores do mTOR em células mononucleares do sangue periférico em estudos clínicos. Rojo et al. (2007) propuseram a utilização de 4EBP1 na avaliação prognóstica em tumores de mama, principalmente naqueles que apresentam uma superexpressão de ErbB-2, demonstrando uma diminuição deste elemento em linhagens celulares tratadas com rapamicina. Noh et al. (2004), também observaram uma diminuição de 4EBP1 e S6K1 em linhagens tratadas com rapamicina. Embora estes elementos sejam importantes na

inibição da rapamicina, eles não podem nos informar o tipo de tumor que responderia a esta droga, talvez por que a sensibilidade a rapamicina não esteja somente na capacidade de inibir mTOR ou por que mTOR não seja o único alvo da rapamicina, ou pela possibilidade de existirem outros substratos do mTOR, além de p-4EBP1 e p-S6K1 (Noh et al., 2004).

O maior desafio no desenvolvimento de um marcador molecular na avaliação da desregulação da via AKT/mTOR são os inúmeros caminhos que levam a transdução de sinal, muitos dos quais ainda não são conhecidos. No entanto independentemente dos mecanismos de desregulação que produzem uma ativação da via do AKT, todos são levados a uma ativação da atividade transcricional de determinados genes. A identificação da avaliação do perfil gênico dos tumores de mama que possuem AKT ativado, ou seja, de uma assinatura gênica do AKT, poderia ser um importante marcador na avaliação dos tumores que responderiam aos inibidores do mTOR (Creighton, 2007).

No presente estudo, para entendermos melhor as vias de sinalização ativadas em resposta a rapamicina, nosso foco principal foi analisar os efeitos deste agente no perfil de expressão gênica das amostras de tumores de mama mantidas em cultura de órgão que permite a preservação da interação entre células epiteliais e estromais, representando um modelo melhor para avaliação da resposta dos tumores sólidos a experimentos com novos medicamentos.

Objetivos

2 Objetivo

Os objetivos do presente estudo são:

- 1) Determinação da ativação de alguns elementos da via do AKT por imunoistoquímica a fins de se identificar os tumores que possivelmente responderiam a rapamicina.
- 2) Avaliar o efeito da rapamicina no perfil de expressão gênica em amostras de tecido de carcinoma de mama mantidos em cultura de órgão que preserva a interação entre células tumorais e estromais, subdivididos em tumores ErbB-2 positivos e ErbB-2 negativos, pois o ErbB-2 está associado à resistência terapêutica, progressão tumoral e ativação da via do AKT.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Estabelecer a metodologia para cultura de órgão.
- 2) Tratamento das fatias de tumores com rapamicina.
- 3) Avaliação das mudanças no perfil gênico por microarray antes e depois do tratamento com rapamicina.
- 4) Análise por Bio-Informática dos genes respectivos.
- 5) Avaliação da via do AKT por imunoistoquímica.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

Foram colhidas 54 amostras de tumores de mama de pacientes submetidas à Biopsia Incisional ou Mastectomia Patey com esvaziamento axilar, provenientes do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer de 14/03/2006 à 11/09/2007, após assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As pacientes participantes de nosso estudo apresentavam tumores maiores do que 2,0 cm e não foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante antes da coleta do tumor (Tabela 1).

Destas amostras, consideramos somente os tumores histologicamente classificados como carcinoma ductal invasivo obedecendo à classificação TNM proposta pela “International Union Against Cancer” (IUAC), sendo eliminados 9 casos de carcinomas lobulares invasivos, 1 caso de carcinoma intraductal e 1 caso em que a paciente era portadora de Hepatite C, restando 43 casos para nosso estudo.

A medida do tumor considerada para o estadiamento clínico foi avaliada por medição direta sobre a pele da mama, obedecendo ao produto dos dois maiores diâmetros obtidos durante o exame clínico realizado no ambulatório.

Foram colhidas amostras de tecido tumoral de 1,0 à 1,5 cm obtidas durante ato cirúrgico realizado no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer. Destas amostras retiravamos inicialmente uma fina fatia com bisturi, a qual era colocada imediatamente em um frasco contendo formol tamponado e denominada de Amostra Imediata (AI). O restante era transferida para um frasco contendo meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Médium)

com adição de ampicilina, estreptomicina e anfotericina B. O material era mantido em geladeira até o momento do transporte para a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no momento do transporte era armazenado em uma bolsa térmica resfriada com gelo. Entre a coleta do material durante ato cirúrgico e o seu transporte para a Faculdade de Medicina (LIM 24) onde realizávamos o processamento das fatias levou-se uma média de 1 a 3 horas.

3.1 Processamento das amostras para cultura de tecido

As amostras de tecidos foram então seccionadas em fatias de cerca de 300 μ m a 400 μ m em um fatiador de tecido fresco (Krumdieck®-Alabama Research and Development Corporation, Birmingham, AL). Todo o procedimento foi realizado em um fluxo laminar de maneira asséptica, evitando-se a contaminação da cultura. (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Unicamp, Brasil),

O fatiador Krumdieck® é de funcionamento automático, totalmente desmontável e construído em aço inoxidável e vidro, o que permite esterilização por meio de calor seco. Este aparelho consiste em dois compartimentos contíguos comunicantes, uma câmara de corte (onde o fragmento do tecido é fatiado) e um vaso coletor (onde as fatias são recolhidas). Durante o funcionamento do equipamento, estes compartimentos permanecem imersos em solução salina tampão (PBS), que os percorre por meio de um fluxo produzido por uma bomba. O fragmento do

tecido fresco a ser fatiado é depositado em um poço cilíndrico (câmara de corte) e abaixo deste cilindro situa-se uma lâmina cortante que por meio de um movimento oscilatório horizontal, produz as fatias. A espessura da fatia é dada pelo ajuste da altura da base do poço cilíndrico e também pela compressão manual do fragmento por meio de um pistão. As fatias produzidas foram então dirigidas ao vaso coletor e recolhidas pela abertura de uma válvula.

Cada amostra colhida produzia uma média 15 fatias com espessura de 300-500µm cada uma, sendo separadas em três grupos :

- Grupo 0 (zero) horas: material representando o tecido coletado a zero hora.
- Grupo Controle 24 horas: material representando o tecido coletado e mantido em meio de cultura por 24 horas.
- Grupo Rapamicina 24 horas: material representando o tecido coletado mantido em meio de cultura com rapamicina por 24 horas.

No Grupo 0 horas as fatias foram colocadas em formol tamponado imediatamente após o procedimento, no Grupo Controle 24 horas, as fatias foram mantidas no meio de cultura descrito a seguir por 24 horas, sendo que uma parte foi colocada em formol tamponado para análise imunoistoquímica e a outra mantida crioconservada em nitrogênio para realizarmos a segunda parte de nosso estudo e no Grupo Rapamicina 24 horas as fatias foram tratadas com 20nM de rapamicina por 24 horas, sendo que uma parte foi colocada em formol tamponado para análise imunoistoquímica e a outra mantida crioconservada em nitrogênio (Figura 11).

Material e Métodos

Os fragmentos de tecidos foram cultivados em um meio de cultura RPMI suplementado com 10% de FBS – Soro Fetal Bovino (Gibco, Nova Iorque, USA), 5 µg/ml de insulina, 500ng/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF, 100µg/ml de ampicilina, 100µg/ml de estreptomicina (Sigma – Aldrich corporation – ST. Louis Missouri, E.U.A.) e 2,5µg/ml de anfotericina B (Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP).

Figura 11. Técnica de coleta e processamento das fatias e cultura dos tecidos tumorais (modificado de van der Kuip et al.,2006).

3.2 Estudo Imunoistoquímico

Na primeira parte de nosso estudo fizemos a análise dos elementos da via da proteína mTOR através de imunoistoquímica utilizando anticorpos fosforilados específicos para identificação de sua atividade em 30 tumores de mama e sua relação com fatores clínico-patológicos como, receptores hormonais, idade, estadiamento, tamanho do tumor, ErbB-2 e p53. Os dados dos receptores hormonais, expressão de ErbB-2 e p53 foram obtidos dos prontuários das pacientes, sendo realizados através de análises imunoistoquímicas no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer de acordo com a padronização do serviço.

A avaliação das reações imunoistoquímicas foi feita de forma semiquantitativa considerando-se o percentual de células marcadas. Os elementos p-AKT (Treonina 308), p-AKT (Serina 473), p-mTOR, p-S6K1, p-4EBP1 e p-eIF4G, foram analisados nas quatro situações: Amostra Imediata, 0 horas, Controle 24 horas e Rapamicina 24 horas. Todas as amostras sofreram o mesmo tipo de processamento e após a avaliação da presença de neoplasia viável através do estudo inicial pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE), os marcadores imunoistoquímicos foram testados.

O estudo imunoistoquímico foi realizado com anticorpos que reconhecem elementos chaves da via do AKT. As reações para cada marcador foram realizadas em duplicata, simultaneamente utilizando-se níveis distantes da amostra dos blocos para que houvesse representação de diferentes áreas de cada tumor.

Material e Métodos

As reações de imunistoquímica seguiram os protocolos padronizados especificados pelos fabricantes. Todas as reações tiveram controles positivos e negativos. A Tabela 2 mostra a lista completa dos anticorpos utilizados.

Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados nas reações de imunistoquímica.

ANTICORPOS	CLONES	TÍTULOS	FABRICANTES
p-mTOR (Ser 2448) (49F9)	Monoclonal feito em coelho	1:800	Cell Signaling # 2976
p-4E-BP1 (Thr 37/46)	Monoclonal feito em coelho	1:100	Cell Signaling # 2855
p-eIF4G (Ser 1108)	Policlonal em coelho	1:200	Cell Signaling # 2441
p-p-70S6 kinase (Thr 389) (1 A 5)	Monoclonal	1:200	Cell Signaling # 9206
p-AKT (Ser473) (736E11)	Monoclonal feito em coelho	1:50	Cell Signaling # 3787
p-AKT (Thr 308) (244F9H2)	Monoclonal feito em coelho	1:50	Cell Signaling # 9266

3.3 Protocolos de Reações Imunistoquímicas

Após o processamento das fatias, os tecidos fixados em formol tamponado foram embebidos em parafina e submetidos a cortes seriados de 3µm de espessura. Em seguida realizou-se a desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60°C e os cortes foram colocados na seguinte sequência: xilol a 60°C por 20 minutos, xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, etanol 100% por 30 segundos, etanol 85% por 30 segundos e etanol 70% por 30 segundos. Após a conclusão dessa etapa as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e mergulhadas em

Material e Métodos

fervura de solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada onde foram mergulhadas e após este procedimento a panela foi lacrada com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, abaixou-se a válvula de segurança e aguardou-se a pressurização total por 4 minutos. A seguir manteve-se a panela fechada sob água corrente por 10 minutos. Destampou-se a panela, deixando-a por mais 10 minutos à temperatura ambiente e finalmente as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Depois procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e em solução salina tamponada com fosfatos (PBS-tampão salina fosfatada) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme indicado na tabela 2, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1% por 18 horas a 4°C em câmara úmida e lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubaram-se as lâminas com Post Primary Block por 30 min a 37° C (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido) e depois foram lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas novamente com o NovoLink Polymer por 30 minutos a 37° C.

Após este procedimento as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas em solução substrato: 60 mg% de 3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA), 1

ml de Dimetilsulfóxido (DMSO), 1 ml de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol), 100 ml de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observou-se ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado como produto final da reação.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água corrente e destilada, imersas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e lavadas novamente em água corrente e destilada.

A seguir as lâminas foram então desidratadas em: etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% 2 vezes por 30 segundos cada e xilol 4 vezes por 30 segundos cada, realizando-se então a montagem das lâminas em *Entellan neu* (Merck).

3.4 Escores utilizados

Os escores utilizados para análise dos resultados imunoistoquímicos relacionados à expressão de p-AKT (Thr 308), p-AKT (Ser 473), p-mTOR, p-4EBP1, p-eIF4G e p-S6K1, foram:

- 0: < 10% das células apresentaram imunorreatividade
- +1: imunorreatividade em 10-20% das células tumorais
- +2: imunorreatividade em 20-50% das células tumorais
- +3: imunorreatividade em mais de 50% das células tumorais

3.5 Extração de RNA total

Após a retirada do tecido mamário, o material foi armazenado em nitrogênio líquido até a data da extração do RNA.

O RNA total foi extraído do tecido mamário, criopreservado, pelo método de Chomezynski e Sacchi, 1987 ; utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 100 mg de tecido congelado, foi pulverizado com Termovac (Telcolab Corporation) em nitrogênio líquido e colocado em um microtubo juntamente com 1ml de Trizol sendo homogeneizado por inversão. Após 10 minutos à temperatura ambiente acrescentou-se 0,2 ml de clorofórmio e homogeneizou-se por inversão, mantendo-se a temperatura ambiente por 5 minutos, sendo em seguida submetido a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a uma temperatura de 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo com 0,6 ml de álcool isopropílico. Após 10 minutos em temperatura ambiente a amostra foi submetida a centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm a uma temperatura de 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1ml de etanol 75%, centrifugou-se por 5 minutos a 7.500 rpm a 4°C, descartando-se novamente o sobrenadante, deixando os tubos escorrendo sobre papel absorvente até secar o “pellet.” Feito isso adicionou-se H₂O miliQ autoclavada tratada com DEPC (Merck) na quantidade suficiente para diluir o “pellet” de RNA.

A integridade e qualidade do RNA extraído foram controladas por eletroforese em gel de agarose 1% coradas com brometo de etídio e a

concentração de absorbância foi feita em espectofotômetro a 260nm e 280nm.

3.6 Transcrição Reversa (RT)

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2µg do RNA acertando o volume para 10,25µl com H₂O miliQ autoclavada, adicionando-se 2,5µg de hexâmeros randômicos iniciadores pd(N)₆ (Amersham Pharmacia Biotech). A mistura dos hexâmeros randômicos e o RNA foram submetidos a um aquecimento de 70°C por 10 minutos, sendo em seguida colocados em gelo por 2 minutos, adicionando-se 5µl do tampão 5x da Super Script II (Invitrogen, Co.) e 2,5µl de dNTPs 2,5mM. Essa mistura foi incubada a 42°C por 10 minutos sendo em seguida adicionado 200U da enzima Super Script II (Invitrogen) e a reação permaneceu por 1 hora a 42°C, sendo então incubada por 15 minutos a 70°C para inativar a enzima transcriptase reversa e o cDNA foi mantido a uma temperatura de – 20°C até o início da reação de PCR.

3.7 Avaliação do perfil gênico por cDNA microarray

3.71. Protocolo de ensaio de cDNA “microarray”

Foi utilizado o Sistema CodeLink (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, St. Giles, UK). Cada lâmina CodeLink (Human Whole Genome Bioarrays) contém aproximadamente 57.000 transcritos e ESTs. O procedimento para a realização de “microarrays” utilizando-se as plataformas CodeLink (Amersham, GE Helthcare Bio-Sciences), baseou-se em protocolo cedido pelo fabricante. As etapas da técnica foram as seguintes: partindo-se de 2 µg de RNA total purificado, procedeu-se a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando-se a enzima transcriptase reversa a 42°C por 2 horas e em seguida a síntese da segunda fita de cDNA, numa reação contendo DNA polimerase e RNase H, por 2 horas a 16°C. Purificou-se este cDNA em coluna apropriada (QIAquick, QIAgen) e este material foi seco em “Speed-Vac” até se obter um volume total de 9,5µl. Deste cDNA obtido realizamos uma transcrição “in vitro” T7- dirigida para obtenção de cRNA. Nesta etapa acrescentou-se à reação UTP marcado com biotina. Após a transcrição, o cRNA foi purificado em colunas RNeasy (QIAgen), quantificado e aliquotado. Este cRNA foi fragmentado e desnaturado. A hibridização ocorreu por 19 horas, em “shaker” com rotação de 300 rpm a 37°C. Após a hibridização, a detecção foi precedida por uma lavagem em 0,75x TNT (solução contendo 1M Tris-HCl, pH 7,5; 5M NaCl e Tween 20) por 1 hora realizada com uma solução de Cy5-estreptoavidina por 30 minutos ao abrigo da luz. A seguir foram feitas lavagens sucessivas

com 1x TNT e uma lavagem final por 30 segundos em solução de 0,1x SSC, 0,05% Tween 20. As lâminas foram finalmente centrifugadas para remoção do excesso de solução de lavagem e digitalizadas utilizando-se o “scanner” GenePix Array. Cada imagem foi analisada através do software CodeLink Expression Analysis. A análise ontológica foi realizada usando o programa Onto-Tools (<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>).

3.8 PCR em tempo real

O método da PCR em tempo real foi utilizado para validação de alguns dos genes encontrados como diferencialmente expressos nas plataformas de “microarray”. A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação a expressão do gene da β -actina. De acordo com as instruções do fabricante do aparelho “Rotor-Gene RG 3000” (Corbett Research), os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de CT (Ciclo do Threshold). Entre as unidades de cada duplicata não ultrapassaram 1,5. Todos os ensaios utilizaram uma mesma amostra referência e um controle negativo, ao qual não foi adicionado cDNA. Para os experimentos foram usados 20mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM de KCl, 200 μ M de dNTP; 5% de DMSO (Dimetil Sulfóxido), concentrações padronizadas dos “primers forward” e “reverse” para cada gene, 1,5mM de MgCl₂, 1,5x de *SYBR Green*, 1,5U de *Platinum[®]* Taq DNA Polymerase (*Invitrogen*) e 200ng do cDNA em um volume final de 20 μ l. As reações se iniciaram a uma temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, após a qual ocorreram 40 ciclos de amplificação. Em

Material e Métodos

cada ciclo, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por um minuto para anelamento dos “primers” e 72°C por um minuto para extensão das duplas-fitas. A curva de dissociação foi realizada no intervalo de variação de temperatura de 72°C a 95°C, sendo 1°C por etapa.

Os oligonucleotídeos usados foram desenhados com o auxílio do programa *Primer 3 Input* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tabela: 3) e os resultados das reações de PCR em tempo real foram analisados com auxílio do programa *Rotor-Gene 6* versão 6.0 (*Corbett Research*). A normalização dos resultados foi feita através dos seguintes cálculos: $\Delta C_T = \text{Média do gene alvo} - \text{Média do gene constitutivo}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{amostra}) - \Delta C_T (\text{amostra referência})$; $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Tabela 3: Oligonucleotídeos usados para reação de RT- PCR

GENE	Nº DE ACESSO DO BANCO DE GENE	PRIMER DIRETO (5'-3')	PRIMER INDIRETO (5'-3')	TAMANHO DO PRODUTO (pb)
WVOX	NM_016373.1	CATACGGATGGGAACAAGAA	TTGGCTTGGTCGGATTATCA	126
EXT1	NM_000127.2	TCCAATCAAAGTGACCCAGA	TATTCATGCAGCTCTGTTCGC	116
GTF2E2	NM_002095.4	TGCAGGAATCTGGACCAAAG	GCCAAGTGTTTCGTTATGAGTC	100
ACTB	NM_001101.3	AGGCTGCCCATACTTATCCA	CCTGCCGTAGAGAAATGGAA	188

Tabela 1 - Características clínico-patológicas de todos as pacientes participantes do estudo

CASO	IDADE	TAMANHO DO TUMOR (CM)	ESTADIA- MENTO	TIPO HISTOLÓGICO	RECEPTORES HORMONAIS		MARCADORES TUMORAIS	
					Estrógeno	Progesterona	p 53	ErbB-2
1	93	3,00	IIA	CDI	positivo	negativo	negativo	negativo
2	52	2,50	IIA	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
3*	62	3,00	IIA	CLI	negativo	negativo	positivo	negativo
4	67	3,00	IIA	CDI	positivo	positivo	negativo	positivo
5	53	3,30	IIB	CDI	positivo	positivo	positivo	negativo
6	67	3,00	IIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
7	53	4,00	IIA	CDI	positivo	positivo	positivo	negativo
8	66	4,00	IIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
9*	87	3,00	IIA	CLI	positivo	positivo	positivo	positivo
10	51	6,00	IIIB	CDI	positivo	positivo	positivo	positivo
11*	68	8,00	IIIB	CLI	positivo	positivo	negativo	positivo
12	64	3,50	IIB	CDI	negativo	negativo	negativo	positivo
13	50	8,00	IIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
14	44	3,00	IIIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
15	46	3,00	IIB	CDI	negativo	negativo	negativo	negativo
16	55	6,00	IIIB	CDI	negativo	positivo	negativo	positivo
17*	57	7,00	IIIB	CLI	positivo	positivo	negativo	negativo
18*	75	3,00	IIIA	CLI	positivo	positivo	positivo	negativo
19	41	6,00	IIIB	CDI	negativo	positivo	positivo	negativo
20	33	3,50	IIIB	CDI	negativo	positivo	negativo	positivo
21	60	6,00	IIIB	CDI	negativo	negativo	positivo	positivo
22	35	7,00	IIIB	CDI	negativo	negativo	positivo	positivo
23	51	3,50	IIB	CDI	negativo	negativo	negativo	negativo
24*	58	4,00	IIB	CDIS	negativo	negativo	positivo	positivo

continuação

Tabela 1 - Características clínico-patológicas de todos as pacientes participantes do estudo

CASO	IDADE	TAMANHO DO TUMOR (CM)	ESTADIA- MENTO	TIPO HISTOLÓGICO	RECEPTORES HORMONAIS		MARCADORES TUMORAIS	
25	71	4,00	IIB	CDI	negativo	positivo	negativo	negativo
26	31	6,00	IIIB	CDI	negativo	negativo	negativo	positivo
27	36	7,00	IIB	CDI	positivo	positivo	negativo	positivo
28*	55	7,00	IIIB	CLI	positivo	positivo	negativo	negativo
29	42	8,00	IIIB	CDI	negativo	negativo	positivo	positivo
30	56	6,00	IIIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
31	68	3,00	IIA	CDI	positivo	positivo	positivo	negativo
32*	75	7,00	IIIB	CLI	positivo	positivo	positivo	negativo
33	59	2,50	IIB	CDI	positivo	positivo	positivo	positivo
34	60	3,50	IIB	CDI	negativo	negativo	negativo	negativo
35	54	3,00	IIB	CDI	negativo	negativo	positivo	negativo
36	42	4,50	IIB	CDI	positivo	positivo	positivo	positivo
37	57	5,00	IIB	CDI	negativo	negativo	positivo	positivo
38	46	4,00	IIIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
39	60	2,50	IIB	CDI	positivo	positivo	negativo	negativo
40	45	7,00	IIB	CDI	negativo	negativo	positivo	negativo
41	52	7,00	IIB	CDI	positivo	positivo	positivo	negativo
42**	66	4,00	IIB	CDI	negativo	negativo	positivo	positivo
43	43	3,50	IIIB	CDI	negativo	negativo	positivo	negativo
44	67	4,00	IIB	CDI	positivo	positivo	positivo	negativo
45	46	8,00	IIIB	CDI	negativo	negativo	positivo	positivo
46	36	5,00	IIB	CDI	negativo	negativo	negativo	positivo
47	67	6,00	IIB	CDI	positivo	negativo	negativo	negativo
48*	80	3,00	IIB	CLI	positivo	positivo	negativo	negativo
49	83	3,00	IIA	CDI	positivo	positivo	negativo	positivo

Conclusão

Tabela 1 - Características clínico-patológicas de todos as pacientes participantes do estudo

CASO	IDADE	TAMANHO DO TUMOR (CM)	ESTADIA-MENTO	TIPO HISTOLÓGICO	RECEPTORES HORMONAIS	MARCADORES TUMORAIS		
50	54	8,00	IIIB	CDI	positvo	positivo	negativo	positivo
51	86	5,00	IIA	CDI	negativo	negativo	positivo	negativo
52	80	7,00	IIB	CDI	negativo	negativo	negativo	positivo
53*	47	7,00	IIIB	CLI	positivo	positivo	positivo	positivo
54	55	7,00	IIIB	CDI	positivo	positivo	positivo	negativo

Casos eliminados do estudo: *CLI,CDIS ; ** Paciente portadora de Hepatite C.

Carcinoma Ductal Invasivo=CDI; Carcinoma Lobular Invasivo=CLI; Carcinoma Intraductal=CDIS

3.9 Método para análise estatística

Utilizamos o teste do Chi-Square para a realização de nossas avaliações estatísticas.

O nível de significância observado foi de 5% ($p < 0,05$) e apenas níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Foram feitas também, análises de correlação utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson.

Todas as análises foram realizadas pelo programa XLSTAT versão 2008.4.02.

Resultados

4 Resultados

Foram analisados 43 amostras de tumores de mama, sendo que a média das pacientes estudadas foi de 55 anos, variando de 31 à 93 anos ($\pm 13,75$) e a média dos tamanhos dos tumores foi de 4,9cm ($\pm 1,83$). As demais características clínico-patológicas das amostras se encontram na tabela 4.

Tabela 4: Características clínico-patológicas dos tumores de mama estudados

	N	%
Carcinoma ductal infiltrativo	43	100,00%
Idade		
≥ 50 anos	29	67,44%
< 50 anos	14	32,56%
Estadiamento		
IIA	03	6,98%
IIB	25	58,14%
IIIB	15	34,88%
Receptores Hormonais		
RE+/PR+	21	48,84%
RE+/PR-	02	4,65%
RE-/PR+	04	9,30%
RE-/PR-	16	37,21%
ErbB-2		
Positivo	18	41,86%
Negativo	25	58,14%
P 53		
Positivo	19	44,19%
Negativo	24	55,81%

A tabela 5 apresenta os resultados imunoistoquímicos dos elementos da via do AKT em fatias de câncer de mama mantidos em cultura de órgão antes e depois do tratamento com rapamicina.

Tabela 5 – Resultados imunoistoquímicos dos elementos da via do AKT.

CASO	*	AMOSTRAS	ER	PR	p53	ErbB-2	p-AKT (Thr)	p-AKT (Ser)	p-mTOR	p-S6K1	p-4EBP1	p-eIF4G
1	5	AI	pos	pos	pos	neg	+1	0	+1	0	+1	+1
		0hs					+1	0	+1	0	+1	+1
		Controle					+1	0	+1	0	+1	+1
		Rapamicina					+1	0	0	0	+1	0
2	6	AI	pos	pos	neg	neg	+3	+1	+3	+2	+2	+2
		0hs					+3	+1	+3	+2	+2	+2
		Controle					+3	0	+1	+1	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	0	+1	+3	+2
3	7	AI	pos	pos	pos	neg	+3	0	0	0	+3	+3
		0hs					+3	0	0	0	+3	+3
		Controle					+3	0	0	0	+3	+3
		Rapamicina					+3	0	0	0	+3	+3
4	10	AI	pos	pos	pos	pos	+2	0	0	+2	1	+1
		0hs					+2	0	0	+2	+2	+1
		Controle					+2	0	0	0	+2	+2
		Rapamicina					+2	0	0	0	+1	+2
5	13	AI	pos	pos	neg	neg	+2	0	+1	+3	+3	+1
		0hs					+2	0	+1	+1	+3	+1
		Controle					+2	0	+1	+1	+3	+1
		Rapamicina					+2	0	0	+1	+3	+1
6	15	AI	neg	neg	neg	neg	+2	0	+1	+3	+1	0
		0hs					+2	0	+1	+3	+1	+1
		Controle					+2	0	+1	+3	+3	+2
		Rapamicina					+2	0	+1	+3	+3	+1
7	22	AI	neg	neg	pos	pos	+1	0	0	+2	+2	0
		0hs					+2	0	0	+1	+2	+1
		Controle					+2	0	0	+1	+2	+1
		Rapamicina					+2	0	0	+1	0	0
8	23	AI	neg	neg	neg	neg	+1	0	0	+3	+3	+1
		0hs					+2	+1	+1	+3	+3	+1
		Controle					+2	+1	0	+1	+2	0
		Rapamicina					+1	0	0	0	0	0
9	25	AI	neg	pos	neg	neg	0	0	+1	+2	+3	+1
		0hs					0	0	+1	+2	+2	+1
		Controle					0	0	+3	+2	+2	0
		Rapamicina					0	0	+3	0	+1	0
10	26	AI	pos	pos	pos	pos	0	0	+1	+3	+2	+2
		0hs					+1	0	+3	+3	+3	+2
		Controle					+1	0	+3	+3	+3	+2
		Rapamicina					0	0	+1	+3	+2	0

continua

Continuação

Tabela 5 – Resultados imunoistoquímicos dos elementos da via do AKT.

CASO	*	AMOSTRAS	ER	PR	p53	ErbB-2	pAKT (Thr)	p-AKT (Ser)	p-mTOR	p-S6K1	p-4EBP1	p-eIF4G
11	27	AI	pos	pos	neg	pos	+1	+2	+2	+1	+3	+2
		0hs					+2	+2	+3	+2	+2	+1
		Controle					+2	+2	+2	+2	+2	+2
		Rapamicina					+1	+2	+2	+1	+1	+1
12	30	AI	pos	pos	pos	pos	+1	0	+2	+3	+3	+2
		0hs					+1	0	+2	+3	+3	+1
		Controle					+1	0	+2	+3	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	+2	+2	+3	+2
13	31	AI	pos	pos	pos	neg	0	0	+2	+2	+2	+2
		0hs					+1	0	+3	+2	+2	+1
		Controle					+1	0	+2	0	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	0	0	+2	+2
14	33	AI	pos	pos	pos	pos	+1	0	+2	+3	+2	+2
		0hs					+2	0	+3	+3	+3	+2
		Controle					+2	0	+3	+3	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	+3	+3	+2	+2
15	34	AI	neg	neg	neg	neg	0	0	+2	+1	+3	+2
		0hs					+1	0	+2	+3	+3	+3
		Controle					+2	0	+2	+3	+3	+3
		Rapamicina					+1	0	+2	+3	+3	+2
16	35	AI	neg	neg	pos	neg	+1	0	+3	+1	+3	+1
		0hs					+1	0	+3	+3	+3	+1
		Controle					+1	0	+3	+3	+3	+1
		Rapamicina					+1	0	+3	+1	+3	+1
17	36	AI	pos	pos	pos	pos	+2	+1	+1	+1	+3	+2
		0hs					+2	+1	+3	+1	+3	+1
		Controle					+2	+1	+3	+1	+3	+2
		Rapamicina					+2	+1	+3	0	0	+1
18	37	AI	neg	neg	pos	pos	0	+1	+2	+1	+2	+1
		0hs					0	+1	+3	+1	+3	+1
		Controle					+1	+1	+3	+2	+3	+1
		Rapamicina					+1	+1	+3	+2	+2	+1
19	38	AI	pos	pos	neg	neg	+1	+1	+1	+3	+2	+1
		0hs					+2	+1	+3	+2	+3	+1
		Controle					+1	+1	+3	+1	+3	+2
		Rapamicina					+1	+1	+3	+1	+2	+1
20	39	AI	pos	pos	neg	neg	+1	+1	+2	0	+3	+2
		0hs					+2	+1	+3	+3	+3	+3
		Controle					+1	+1	+2	+3	+3	+2
		Rapamicina					+1	+1	+1	+3	+2	+1

continua

Tabela 5 – Resultados imunoistoquímicos dos elementos da via do AKT.

CASO	*	AMOSTRAS	ER	PR	p53	ErbB-2	p-AKT (Thr)	p-AKT (Ser)	p-mTOR	p-S6K1	p-4EBP1	p-eIF4G
21	41	AI	pos	pos	pos	neg	0	0	+3	0	+2	+1
		0hs					+1	0	+3	+2	+3	+2
		Controle					+1	0	+3	+2	+2	+1
		Rapamicina					+1	0	+3	0	+2	+1
22	43	AI	neg	neg	pos	neg	+1	0	+1	+3	+1	+1
		0hs					+1	0	0	+2	+3	+3
		Controle					+1	0	+1	+3	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	+1	+1	+2	+2
23	44	AI	pos	pos	neg	neg	0	0	+2	+1	+2	+1
		0hs					+1	0	+2	+3	+2	+2
		Controle					+1	0	+3	+3	+2	+1
		Rapamicina					+1	0	+3	+3	+2	+1
24	45	AI	neg	neg	pos	pos	+1	0	+1	+2	+3	+2
		0hs					+1	0	+1	+3	+3	+2
		Controle					+1	0	+1	+3	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	+1	+2	+2	+2
25	46	AI	neg	neg	neg	pos	0	0	+1	+1	+3	+2
		0hs					0	0	+2	+1	+3	+2
		Controle					+2	0	+1	0	+3	+2
		Rapamicina					+1	0	+1	0	+3	+2
26	49	AI	pos	pos	neg	pos	+2	+1	0	+1	+3	+1
		0hs					+2	+1	+2	+2	+3	+1
		Controle					+1	+1	+1	+1	+3	+1
		Rapamicina					0	+1	+1	+1	+3	+1
27	50	AI	pos	pos	neg	pos	0	+1	+3	+1	0	+1
		0hs					0	+1	+3	+1	+1	+1
		Controle					0	+1	+2	+1	+1	0
		Rapamicina					0	+1	+1	+1	0	0
28	51	AI	neg	neg	pos	neg	+2	+2	0	+1	+2	+2
		0hs					+1	+1	0	+1	+2	+2
		Controle					+1	+1	0	0	+2	0
		Rapamicina					+1	+1	0	0	0	0
29	52	AI	neg	neg	neg	pos	+1	+1	+2	+1	+2	+1
		0hs					0	+1	+2	+1	+2	+1
		Controle					0	+1	0	0	+2	+1
		Rapamicina					0	+1	0	0	+1	+1
30	54	AI	pos	pos	pos	neg	+1	+1	+2	+1	+3	+2
		0hs					0	+1	+3	+2	+3	+2
		Controle					+1	+1	+2	+1	+3	+1
		Rapamicina					+1	+1	+2	0	+2	+1

*Numeração referente aos casos relacionados na tabela 1
(neg = negativo; pos = positivo; AI = Amostra Imediata)

Em relação a análise dos casos controle, p-AKT (Thr 308) apresentou-se expresso em 90% dos casos, p-AKT (Ser 473) em 36,7% , p-mTOR com 80%, p-S6K1 com 76,7%, p-4EBP1 em 100% e p-eIF4G em 86,7% dos casos.

Após o tratamento com rapamicina, não observamos uma variação significativa dos elementos da via do AKT dos casos tratados em relação aos casos controles, com exceção do p- 4EBP1 que apresentou-se significativamente reduzido em 60% dos casos. Em relação aos outros elementos houve uma redução de 26,7% de p-AKT (Thr 308), 3,3% de p-AKT (Ser 473), 23,3% de p-mTOR, 33,3% de p-S6K1 e 30% de p-eIF4G.

Nas tabelas de 6 a 11 podemos verificar o grau de diminuição dos elementos da via do AKT nos casos controles (pelo eixo vertical) em relação aos casos tratados (eixo horizontal). Os valores em destaque relacionam-se aos casos que apresentaram redução, com seus respectivos percentuais de redução.

Tabela 6 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-AKT (Thr).

p-AKT(Thr)		RAPAMICINA						
		0	+1	+2	+3	TOTAL	Total Reduções	
CONTROLE	0	3	0	0	0	3	0	
	+1	2	13	0	0	15	2	13,33%
	+2	0	5	5	0	10	5	50,00%
	+3	0	1	0	1	2	1	50,00%
	TOTAL	5	19	5	1	30	8	26,67%

Tabela 7 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-AKT (Ser).

p-AKT(Ser)		RAPAMICINA						
		0	+1	+2	+3	TOTAL	Total Reduções	
CONTROLE	0	19	0	0	0	19	0	
	+1	1	9	0	0	10	1	10,00%
	+2	0	0	1	0	1	0	0,00%
	+3	0	0	0	0	0	0	0,00%
	TOTAL	20	9	1	0	30	1	3,33%

Tabela 8 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-mTOR

p-mTOR		RAPAMICINA						
		0	+1	+2	+3	TOTAL	Total Reduções	
CONTROLE	0	6	0	0	0	6	0	
	+1	3	5	0	0	8	3	37,50%
	+2	1	2	4	0	7	3	42,86%
	+3	0	1	0	8	9	1	11,11%
	TOTAL	10	8	4	8	30	7	23,33%

Tabela 9 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-S6K1.

p-S6K1		RAPAMICINA						
		0	+1	+2	+3	TOTAL	Total Reduções	
CONTROLE	0	7	0	0	0	7	0	
	+1	3	6	0	0	9	3	33,33%
	+2	2	1	1	0	4	3	75,00%
	+3	0	2	2	6	10	4	40,00%
	TOTAL	12	9	3	6	30	10	33,33%

Tabela 10 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-4EBP1

p-4EBP1		RAPAMICINA						
		0	+1	+2	+3	TOTAL	Total Reduções	
CONTROLE	0	0	0	0	0	0	0	
	+1	1	1	0	0	2	1	50,00%
	+2	3	4	2	0	9	7	77,78%
	+3	1	0	9	9	19	10	52,63%
	TOTAL	5	5	11	9	30	18	60,00%

Tabela 11 – Relação do grau de diminuição dos casos tratados com rapamicina em relação aos casos controles avaliados por imunistoquímica p-eIF4G

p-eIF4G		RAPAMICINA						
		0	+1	+2	+3	TOTAL	Total Reduções	
CONTROLE	0	4	0	0	0	4	0	
	+1	2	8	0	0	10	2	20,00%
	+2	1	5	8	0	14	6	42,86%
	+3	0	0	1	1	2	1	50,00%
	TOTAL	7	13	9	1	30	9	30,00%

Abaixo, representamos graficamente a relação da diminuição dos elementos da via do AKT dos casos controles (C) em relação aos casos tratados com rapamicina (R).

Gráfico 1 - Relação da diminuição de p-AKT (Ser 473) nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina

Gráfico 2 - Relação da diminuição de p-AKT (Thr 308) nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina.

Gráfico 3 - Relação da diminuição de p-S6K1 nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina

Gráfico 4 - Relação da diminuição de p-4EBP1 nos casos controle em relação aos tratados com rapamicina.

Comparamos a expressão de p-AKT (Thr308), p-AKT (Ser473), p-mTOR, p-4EBP1, p-eIF4G e p-S6K1 com fatores clínico-patológicos dos tumores obtidos dos prontuários das pacientes, tais como idade, estadiamento, receptores hormonais (estrógeno e progesterona), expressão de ErbB-2 e p53, conforme tabelas 12 a 17 e observamos que o único elemento que apresentou relação com p-AKT (Thr308) foi o p53. A análise da proporção de p-AKT (Thr 308), p-AKT (Ser 473), p-mTOR, p-4EBP1, p-eIF4G, p-S6K1 e fatores clínico-patológicos, foi realizado através do teste Chi-Square.

Tabela 12 – Relação do p-AKT (Thr 308) com fatores clínico-patológicos

alpha = 0,05			p-AKT (Thr 308)				p
			0	1	2	3	
ER	-	12	2	5	5	0	0,40
	+	18	1	10	5	2	
PR	-	11	1	5	5	0	0,57
	+	19	2	10	5	2	
p53	-	14	3	4	6	1	0,09
	+	16	0	11	4	1	
ErbB-2	-	17	1	10	4	2	0,27
	+	13	2	5	6	0	
Idade		30	3	15	10	2	0,54
			(54-80)	(31-86)	(35-60)	(53-67)	
ESTADIAMENTO	IIA	4	0	3	0	1	0,50
	IIB	16	2	7	6	1	
	IIIB	10	1	5	4	0	

Tabela 13 – Relação do p-AKT (Ser 473) com fatores clínico-patológicos

alpha = 0,05			p-AKT (Ser 473)				p
			0	1	2	3	
ER	-	12	8	4	0	0	0,70
	+	18	11	6	1	0	
PR	-	11	7	4	0	0	0,73
	+	19	12	6	1	0	
p53	-	14	7	6	1	0	0,27
	+	16	12	4	0	0	
ErbB-2	-	17	12	5	0	0	0,40
	+	13	7	5	1	0	
Idade		30	19	10	1	0	0,80
			(31-71)	(42-86)	(36-36)	0	
ESTADIAMENTO	IIA	4	2	2	0	0	0,63
	IIB	16	11	5	0	0	
	IIIB	10	6	3	1	0	

Tabela 14 – Relação do p-mTOR com fatores clínico-patológicos

alpha = 0,05			p-mTOR				p
			0	1	2	3	
ER	-	12	4	4	1	3	0,24
	+	18	2	4	6	6	
PR	-	11	4	4	1	2	0,15
	+	19	2	4	6	7	
p53	-	14	2	5	4	3	0,54
	+	16	4	3	3	6	
ErbB-2	-	17	3	5	4	5	0,97
	+	13	3	3	3	4	
Idade		30	6	8	7	9	0,27
			(35-86)	(36-83)	(36-68)	(31-71)	
ESTADIAMENTO	IIA	4	2	1	1	0	0,31
	IIB	16	2	5	2	7	
	IIIB	10	2	2	4	2	

Tabela 15 – Relação do p-S6K1 com fatores clínico-patológicos

alpha = 0,05			p-S6K1				p
			0	1	2	3	
ER	-	12	3	2	2	5	0,62
	+	18	4	7	2	5	
PR	-	11	3	2	1	5	0,59
	+	19	4	7	3	5	
p53	-	14	2	6	2	4	0,46
	+	16	5	3	2	6	
ErbB-2	-	17	4	5	2	6	0,99
	+	13	3	4	2	4	
Idade		30	7	9	4	10	0,26
			(36-86)	(35-83)	(36-71)	(31-67)	
ESTADIAMENTO	IIA	4	3	1	0	0	0,11
	IIB	16	3	3	3	7	
	IIIB	10	1	5	1	3	

Tabela 16 – Relação do p-4EBP1 com fatores clínico-patológicos

alpha = 0,05			p-4EBP1			p
			1	2	3	
ER	-	12	0	5	7	0,31
	+	18	2	4	12	
PR	-	11	0	4	7	0,50
	+	19	2	5	12	
p53	-	14	1	5	8	0,80
	+	16	1	4	11	
ErbB-2	-	17	1	5	11	0,97
	+	13	1	4	8	
Idade		30	2	9	19	0,63
			(53-54)	(35-86)	(31-83)	
ESTADIAMENTO	IIA	4	0	1	3	0,97
	IIB	16	1	5	10	
	IIIB	10	1	3	6	

Tabela 17 – Relação do p-eIF4G com fatores clínico-patológicos

alpha = 0,05			p-eIF4G				p
			0	1	2	3	
ER	-	12	3	4	4	1	0,41
	+	18	1	6	10	1	
PR	-	11	2	4	4	1	0,83
	+	19	2	6	10	1	
p53	-	14	3	4	6	1	0,67
	+	16	1	6	8	1	
ErbB-2	-	17	3	6	6	2	0,36
	+	13	1	4	8	0	
Idade		30	4	10	14	2	0,59
			(51-86)	(35-83)	(31-68)	(53-60)	
ESTADIAMENTO	IIA	4	1	1	1	1	0,65
	IIB	16	2	6	7	1	
	IIIB	10	1	3	6	0	

Nas fotomicrografias abaixo verificamos a imurreatividade nas células neoplásicas mantidas em cultura de órgão de p-4EBP1, p-S6K1 e p-AKT.

Figura 12 – A) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-4EBP1 (100x). B) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão após tratamento com rapamicina (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-4EBP1 (100x)

Figura 13 – A) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-S6K1 (100x). B) Fotomicrografia de tumor de mama mantido em cultura de órgão após tratamento com rapamicina (24 horas). Expressão imunoistoquímica do p-S6K1 (100x)

Figura 14 - Fotomicrografia de tumor de mama representando o tecido coletado a zero hora. Expressão imunoistoquímica do p-AKT(Thr) (100x).

Para a análise da avaliação do perfil gênico escolhemos 10 casos aleatoriamente dentre os 43 casos inicialmente colhidos para a realização da segunda parte de nosso estudo. Estes casos foram subdivididos igualmente em ErbB-2 positivos e ErbB-2 negativos, sendo realizada a análise por “microarray” dos RNAs extraídos das fatias submetidas à cultura de órgão nos casos controle e tratados com rapamicina. Para esta análise utilizamos 20 lâminas de “microarray” que apresentam uma média de 57.000 genes cada uma. Após hibridização, as lâminas foram digitalizadas e analisadas através do software CodeLink Expression Analysis. A análise ontológica foi realizada usando o programa Onto-Tools (<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>).

Foram obtidos 299 genes que apresentavam uma expressão diferencial com $p \leq 0,01$; dos quais 136 pertenciam ao grupo dos tumores ErbB-2 negativos e 161 pertenciam ao grupo ErbB-2 positivos. Dos 136 genes diferencialmente expressos no grupo ErbB-2 negativo, 70 (51%) apresentaram-se sub-expressados e 66 (49%) superexpressados. No grupo ErbB-2 positivo, dos 161 genes diferencialmente expressos, 142 (88%) apresentaram-se sub-expressados e 19 (12%) superexpressados. Nos gráficos a seguir representamos percentualmente os genes diferencialmente expressos (t-student test) em amostras de tumores de mama mantidos em cultura de órgão e subdivididos em ErbB-2 negativo e positivo.

Gráfico 5 - Percentual dos genes diferencialmente expressos no grupo de tumores ErbB-2 negativo.

Gráfico 6 – Percentual dos genes diferencialmente expressos no grupo de tumores ErbB-2 positivo.

Após normalização, os genes diferencialmente expressos foram selecionados obedecendo-se o seguinte critério: genes superexpressados que apresentaram uma variação de expressão $\geq 1,3$ e genes sub-

expressados que apresentaram uma variação de expressão $< 1,3$ entre os resultados dos casos controle e tratados. Os genes obtidos foram classificados ontologicamente de acordo com o programa Onto-Tools. (<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>). Os resultados estão apresentados na tabela 18.

Tabela 18 - Classes funcionais dos genes afetados pela rapamicina.

	Erb B-2 positivo	Erb B-2 negativo
Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata)	CD22↓, KLRF1↓, IL7R↓	IGSF2↑
Apoptosis	SCARB1↓	MRPS30↓, API5↓, RNF130↑
Cell adhesion	SCARB1↓, ITGB1↓	OBSCN↓, PARVB↓
Cell proliferation	CHRM1↓, ZMYND11↓	CREG1↓
Cell surface receptor linked signal transduction	KLRF1↓, IL7R↓	IGSF2↑
cell-cell signaling	LEFTY2↓, FGF11↓	SHH↑
Development	LEFTY2↓, GCNT2↑, GATA4↓, DACH1↑, DIP2A↑, ITGB1↓, CRABP↓1	PHC3↑, SHH↑, VANG1↑, LRP6↑, CREG1↓
Electron transport	AASS↑	DPYD↓, PDIA6↓
Endocytosis	PACSIN2↓	LRP6↑
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	TGM2↓, OR10K1↓	GLP2R↑, PRB1↑

continua

continuação

Tabela 18 - Classes funcionais dos genes afetados pela rapamicina.

	Erb B-2 positivo	Erb B-2 negativo
Intracellular protein transport	PACSIN2↓	EXPH5↑, SNAPAP↓, KPNA2↓
Ion transport	SLC23A1↓	MRS2L↑
Metabolism	WWOX↓, PC↓, PPAT↓, DIP2A↑, CAPN5↓	SLC27A3↑, LYCAT↓, DHRS1↓, CDYL↓, SHH↑
mRNA export from nucleus	KHSRP↓	NUP133↓
Multidrug transport	FLJ10847↑	
Nervous system development	CHRM1↓, FGF11↓	MBNL1↑
Nuclear mRNA splicing, via spliceosome	KHSRP↓	RBM17↓, PRPF3↓, SFRS9↓
Phosphate transport	COLQ↓	FCN1↑
Protein amino acid phosphorylation	PRKCQ↓	TP53RK↓, ACVR2A↑, MAPK9↓, CAMK2D↑, OXSR1↓, PAK6↑
Protein biosynthesis	EIF4B↓	MRPS30↓, TSFM↓, MRPL37↓
Protein modification	CHRM1↓, PAM↓	LOX↓
Protein transport	SNX22↓	NUP133↓, HSP90B1↓, TOMM40L↑
Proteolysis	CAPN5↓	NPEPPS↓, RNF130↑, SHH↑
Regulation of cell growth	PRKCQ↓	CAMK2D↑, CREG1↓

continua

conclusão

Tabela 18 - Classes funcionais dos genes afetados pela rapamicina.

	Erb B-2 positivo	Erb B-2 negativo
Regulation of transcription	EP400↓, TFEB↓	MRS2L↑, TFEB↓
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	MTF1↑, KLF7↓	CREG1↓, KLF7↓
Regulation of transcription, DNA-dependent	DACH1↑, KHRSP↓, GATAD2B↓, GATA4↓, TFEB↓, NR3C2↓, MXD4↓, ZMYND11↓, FBXL11↓, ZNF134↓, THRB↓	RORA↑, HOXB5↑, SMAD3↑, ZNF91↑, ZBTB11↓, GTF2E2↓
Response to oxidative stress	LPO↓	OXSRI↓
Response to stimulus	OR10K1↓	PRPF3↓
RNA splicing	KHSRP↓	PRPF3↓
rRNA processing	NOLC1↓	KIAA1008↓
Signal transduction	CHRM1↓, FGF11↓, CAPN5↓, OR10K1↓, NR3C2↓, CRABP1↓, EXT1↓	RORA↑, GLP2R↑, IQGAP1↑
Transcription	KHSRP↑, GATAD2B↓, GATA4↓, MTF1↑, NR3C2↓, ZMYND11↓, DACH1↑, ZNF134↓, KLF7↓	ZBTB11↓, RORA↑, GTF2E2↓, SMAD3↑, ZNF91↑
Transcription from RNA polymerase II promoter	GATA4↓	SMAD3↑
Transport	SCARB1↓, KHSRP↓, ABCD4↓, ABCC10↓, CRABP1↓	SLC44A1↓, API5↓, SLC25A13↓, SLC35B3↓
Ubiquitin cycle	FBXL11↓	USP29↑, USP10↓

Realizamos uma análise através de RT-PCR em três genes escolhidos aleatoriamente para confirmarmos os resultados obtidos na análise microarray: WWOX, EXT1 e GTF2E2. A análise por meio de RT-PCR foi feita em 8 amostras escolhidas aleatoriamente das 43 iniciais, diferentes dos

casos utilizados na análise de microarray. Os resultados obtidos através da análise por RT-PCR validaram estes genes em aproximadamente 60% dos casos.

Os gráficos abaixo representam a validação dos genes por RT-PCR em amostras independentes. O eixo x indica valores obtidos com amostras individuais.

Gráfico 7 - Gene EXT1 avaliado através de RT-PCR em amostras individuais

Gráfico 8: Gene WWOX avaliado através de RT-PCR em amostras individuais

Gráfico 9: Gene GTF2E2 avaliado através de RT-PCR em amostras individuais

Discussão

5 DISCUSSÃO

A proteína TOR (alvo da rapamicina) funciona como um reostato regulando a taxa de crescimento e proliferação celular e sua inibição irá mimetizar uma deprivação de nutrientes e fatores de crescimento limitando o crescimento celular. Estas funções do TOR, levaram pesquisadores a desenvolverem novas drogas para o tratamento do câncer. (Shamji et al.,2003; Fingar e Blenis,2004).

Estudos demonstraram a redução de crescimento e proliferação celulares em modelos de ratos com lesões de mama invasivas tratadas com rapamicina e também a inibição da malignização em lesões pré malignas quando a via PI3K/AKT estava ativada, fazendo com que a rapamicina se torne uma droga promissora na quimioprevenção e tratamento, principalmente se a via do AKT estiver ativada (Namba et al.,2006).

A maioria dos pesquisadores utilizam-se de linhagens celulares ou animais como modelo de estudo no câncer. Em relação aos estudos para verificação dos efeitos dos inibidores do mTOR foram realizados em linhagens celulares mamárias, observando-se importante diminuição da proliferação celular dependendo do tipo de linhagem e quantidade de rapamicina utilizada (Noh et al.,2004; Rojo et al.,2007).

As linhagens celulares apresentam algumas vantagens como facilidade de manuseio, alto potencial replicativo e homogeneidade, no entanto podem ocorrer mudanças fenotípicas pela ação do tempo e pela seleção de especificidade (Burdall et al.,2003).

No quadro abaixo listamos vários estudos realizados entre 2001 e 2007 que estudaram a via AKT/mTOR e os inibidores do mTOR em linhagens celulares ou outros modelos de estudo.

Quadro 2 - Estudos realizados entre 2001 e 2007 que estudaram a via AKT/mTOR e os inibidores do mTOR em linhagens celulares ou outros modelos de estudo.

ARTIGO	AUTOR/ANO	LINHAGENS CELULARES OU MODELOS EXPERIMENTAIS
ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth	Hermanto et al.,2001	MCF-7,,T-47D,MDA-MB-231,SK-BR-3,BT-474,MDA-MB-453
mTOR,a novel target in breast cancer:the effect of CCI-779,an mTOR inhibitor,in preclinical models of breast cancer	Yu et al.,2001	MCF-7,BT-474,BT-549,T-47D,SK-BR-3,MDA-MB-231,MDA-MB-468,BT-474,MDA-MB-435
Pharmacodynamic evaluation of CCI-779,an inhibitor of mTOR,in cancer patients	Peralba et al.,2003	MDA-MB-468,Raji cells(Linfoma de Burkitt)
Inhibition od mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant AKT activity	deGraffenried et al.,2004	MCF-7
Determinants of Rapamycin sensitivity in breast cancer cells	Noh et al.,2004	MCF-7,BT-20,BT-549,SK-BR-3,MDA-MB-231,MDA-MB-361,MDA-MB-468,BT-474,BT-483,T-47D,MDA-MB-453,ZR-75-1
Activation of the AKT/mammalian target of rapamycin/4EBP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers	Zhou et al.,2004	MDA-MB-453,MCF-7,BT-474

Rapamycin inhibits growth of premalignant and malignant mammary lesions in a mouse model of ductal carcinoma in situ	Namba et al.,2006	modelos de ratos Tg(MMTV-PyV-mt)
The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells	Shapira et al.,2006	MDA-MB-231,T47D
Rapamycin inhibits proliferation of estrogen receptor positive breast cancer cells	Chang et al.,2007	MCF-7,MDAMB-231,SKBR3,T47D
4E-Binding Protein 1,a cell signalling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis	Rojo et al.,2007	BT-474,MDA-MB-468,T-47-D,DiFi,A431

A linhagem celular mamária MCF-7, que é a mais utilizada em modelos de estudos em câncer de mama, originou-se da “Michigan Cancer Foundation” em 1973 proveniente de efusões pleurais. Embora morfológicamente semelhantes, estas células quando provindas de diferentes laboratórios apresentavam diferenças quanto as taxas de crescimento, expressão de receptores hormonais e cariótipos (Osborne et al.,1987). Existem inúmeras outras linhagens celulares que são utilizadas rotineiramente em modelos de estudos no câncer de mama e em sua maioria não são originárias de tumores de mama primários, mas de metástases tumorais, como aspirados e efusões pleurais, portanto os estudos baseados nelas refletem um estágio mais avançado da doença (Burdall et al.,2003).

No quadro abaixo estão listadas as linhagens celulares de câncer de mama mais citadas segundo a PubMed de 1º de janeiro de 1990 à 31 de dezembro de 2002 (Burdall et al.,2003).

Quadro 3 - Origens das linhagens celulares de câncer de mama mais citadas nas publicações de acordo com a PubMed de 1º de janeiro de 1990 à 31 de dezembro de 2002 (modificado de Burdall et al.,2003).

LINHAGEM CELULAR	ORIGEM	IDADE ANOS	PATOLOGIA	CITAÇÕES	REFERÊNCIA
BT20	Mama	74	Carcinoma ductal invasivo	260	Ozzello et al.,1974
MDA-MB-231	Efusão Pleural	51	Adenocarcinoma	1157	Cailleau et al.,1974; Cailleau et al.,1978
MDA-MB-435	Efusão Pleural	31	Carcinoma ductal invasivo	292	Cailleau et al.,1978
MDA-MB-468	Efusão Pleural	51	Adenocarcinoma	223	Cailleau et al.,1978
MCF-7	Efusão Pleural	69	Carcinoma ductal invasivo	5774	Soule et al.,1973
SKBR3	Efusão Pleural	43	Adenocarcinoma	203	Trempe, 1976
T47D	Efusão Pleural	54	Carcinoma ductal invasivo	866	Keydar et al.,1979
ZR75.1	Ascites	47	Carcinoma ductal invasivo	590	Engel et al.,1978

A compreensão das interações entre o epitélio e estroma no interior da glândula mamária neoplásica e seu papel em resposta às drogas é ainda rudimentar devido ao fato de que em geral são utilizadas como modelo de estudo, linhagens celulares que não refletem completamente o tumor primário de origem, pois perderam as interações célula-célula e célula-matriz (Burdall et al.,2003).

Existem evidências de que o desenvolvimento do câncer de mama e sua resposta à terapias antineoplásicas não dependem somente das alterações de clones malignos, como também de interações específicas

entre células tumorais e componentes do microambiente mamário (Adriance et al.,2005).

A arquitetura do tecido mamário depende das interações células-células e células-matriz-extracelular, envolvendo trocas mecânicas e bioquímicas para manter sua homeostase. A perda ou mudança dessas interações ocorrem durante o processo de malignização (Grobstein,1967; Bissel et al., 2002). É importante a identificação dos componentes intracelulares e extracelulares responsáveis pela manutenção da estrutura e função da glândula mamária, ou seja, o conhecimento de seu microambiente (Hansen e Bissel, 2000).

O epitélio mamário apresenta uma estrutura composta de duas camadas, a camada interna constituída por células epiteliais luminais e a camada externa constituída por células mioepiteliais. As células epiteliais luminais estão em contato direto com o lúmen do ducto e alvéolo e as células mioepiteliais estão em contato com as lamininas da membrana basal. (Ronnov-Jessen et al.,1996). A membrana basal separa as células epiteliais do estroma que representa 80% do volume mamário. No carcinoma invasivo, há uma perda das células mioepiteliais diferenciadas e rotura da membrana basal permitindo que as células tumorais entrem em contato direto com o estroma (Drife,1986, Ronnov-Jessen et al.,1996, Hansen e Bissel,2000). O estroma da glândula mamária normal é constituído na sua maior parte de fibroblastos e adipócitos que em presença de células tumorais apresentarão mudanças em sua composição celular e quantidade de proteínas (reação estromal ou desmoplasia). A maioria das mudanças ocorrem nos

miofibroblastos que produzem proteases responsáveis pela degradação da matriz extracelular, contribuindo para invasão tumoral (Wolf et al.,1993; Unden et al.,1996).

Vários modelos experimentais demonstraram a importância da interação entre o epitélio e estroma para a proliferação e diferenciação das células epiteliais tanto “in vivo” quanto “in vitro” e esta interação não pode ser reproduzida nas linhagens celulares. A manutenção desta interação e a possibilidade de se manter uma estrutura tridimensional do tecido são as principais vantagens do modelo de cultura de células sobre as linhagens celulares. Para investigar o comportamento de uma célula tumoral “ex-vivo” é necessário manter ou reconstituir o microambiente e uma possibilidade da manutenção da arquitetura tissular “ex-vivo” é o cultivo direto de material tumoral fresco, ou seja, a cultura de órgão (Ceriani et al.,1972; Ronnov-Jessen et al.,1996).

No primeiro experimento feito nesta direção foram utilizados pedaços de tumores cortados em cubos de aproximadamente 1mm³, no entanto um dos inconvenientes deste estudo foi a baixa difusão de oxigênio e nutrientes no centro destes tecidos, levando a morte celular (Matoska e Stricker, 1967).

Hillman et al.(1983), manteve o epitélio de tecido mamário normal em cultura viável por 1 a 3 meses e em dois casos por mais de 6 meses. Na maioria dos casos houve mudanças da atividade secretória dos ductos típica das mudanças relativas ao ciclo menstrual. Os autores implantaram estes tecidos mantidos em cultura em ratos, conseguindo mantê-los preservados por mais de dois anos e meio nestes animais.

Diversos estudos mantiveram o tecido mamário normal em cultura de órgão por mais de três semanas, demonstrando uma preservação da integridade morfológica e histológica dos ductos, lóbulos e estroma e uma manutenção da conexão entre estroma e células epiteliais. Em um destes estudos, o tecido mamário foi cortado em pedaços de aproximadamente $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ com uma fina tesoura (Eigélienè et al., 2006) e mantidos em meio de cultura, segundo o método de Trowell modificado (Trowell, 1959; Hillman et al., 1983).

Outros experimentos utilizaram micrótomo de tecido a fim de obter fatias de tumores de mama com espessura de $200 \mu\text{m}$ e 5 mm de diâmetro (Krumdieck et al., 1980). Van der Kuip et al. (2006), desenvolveram uma metodologia para identificação da viabilidade das fatias tumorais, utilizando TMRM (tetrametil-rodamina), que detecta células vivas; Syto®63 que atravessa a membrana basal das células, corando células vivas e mortas e o Picogreen ou iodeto de propídio que são DNA seletivos e coram células mortas.

Todos estes estudos favoráveis publicados na literatura sobre a cultura de órgão como utilização para modelo de estudo na avaliação de novas drogas no tratamento do câncer de mama, foram importantes para o desenvolvimento de nossa metodologia de corte de tecido, onde fatiamos os tumores com o micrótomo de tecido (Krumdieck) obtendo cortes de tecido de 200 à $500 \mu\text{m}$. Estas fatias foram mantidas para estudo em um meio de cultura suplementado similar ao utilizado por Eigélienè et al., 2006 e

verificamos que com esta técnica neste meio de cultura foi possível manter tumor colhido a fresco sem perda significativa da viabilidade celular.

Rojo de al. (2007), fizeram a análise de elementos da via AKT (p-AKT, p-4EBP1, p-S6K1) em amostras de tumores frescos por Western blot e compararam os mesmos tumores fixados em formol com a análise imunoistoquímica, observando uma forte correlação entre a expressão destes elementos da via analisados nas duas metodologias, validando os resultados obtidos na análise imunoistoquímica através da análise por meio de Western blot, onde foram utilizados os mesmos anticorpos.

Na primeira parte de nosso estudo fizemos a análise imunoistoquímica dos elementos da via do mTOR através de anticorpos fosforilados específicos para identificação de sua atividade em fatias de trinta casos de carcinoma ductal invasivo de mama mantidas em cultura de órgão e suas relações com idade, estadiamento, receptores hormonais, expressão de ErbB-2 e p53 e encontramos uma relação significativa entre p-AKT (T 308) e p53 ($p < 0,09$), indo de encontro aos dados da literatura, pois o p53 ativado age como um regulador negativo da proteína mTOR, ou seja, por se encontrar geralmente mutado no câncer favorece uma ativação constitutiva do mTOR contribuindo para carcinogênese (Faivre et al., 2006). Noh et al. (2007), também não encontraram relação do p-AKT e S6K1 com outros fatores prognósticos como, idade, tamanho do tumor, comprometimento axilar, receptor hormonal ou expressão de Erb-B2.

A maioria de nossas amostras expressaram p-AKT devido ao fato dos tumores serem colhidos em pacientes com estadiamentos mais avançados

como IIA, IIB e IIIB. O estudo em cultura de órgão não pode ser realizado em tumores menores do que 3 cm, uma vez que precisamos de pelo menos 2cm para obtermos fatias suficientes. Esta talvez seja uma das maiores limitações do método, principalmente em países desenvolvidos onde o eficiente sistema de rastreamento permite a detecção de tumores cada vez mais precocemente (Burdall et al.,2003).

Alguns autores descreveram a ocorrência de ativação da via do AKT/mTOR quando o material fica submerso em meio suplementado de cultura como o utilizado em nosso estudo (deGraffenried et al., 2004; Chang et al., 2007), no entanto não observamos esta alteração quando avaliamos a expressão dos elementos da via AKT analisados por imunistoquímica em nossa amostra denominada Amostra Imediata em relação aos casos 0 horas e casos controles 24 horas.

O efeito antiproliferativo da rapamicina está muito bem estabelecido e descrito na literatura. Tumores invasivos e lesões pré malignas tratados com rapamicina demonstraram uma importante diminuição da expressão de S6K1, 4EBP1 e ciclina D1 (Namba et al.,2006). A inibição da proliferação celular em linhagens celulares de câncer de mama tratadas com rapamicina varia conforme a concentração e o tempo de exposição à droga. O tratamento destas células na dosagem de 20nM por 24 horas foram efetivas na inibição da fosforilação de S6K1 e 4EBP1 e a porcentagem de células retidas em G1 foi máxima nas primeiras 24 horas do tratamento (Shapira et al.,2006), demonstrando que a concentração de 20nM de rapamicina

utilizada em estudos realizados em linhagens celulares efetivamente afeta a via mTOR (Peng et al.,2002, Shapira et al.,2006).

Em nosso estudo observamos que os elementos da via do AKT não estavam presentes nas áreas de tecido mamário normais que margeavam os tumores, de acordo com os resultados de Zhou et al.(2004) que verificaram que a fosforilação de AKT, mTOR e 4EBP1 aumentam progressivamente quando se analisa tecido mamário normal, hiperplasia típica e atípica, carcinoma intraductal e carcinoma invasor, indicando que a via AKT está envolvida em eventos precoces da transformação oncogênica do epitélio mamário e a ativação destes elementos estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer. Os efeitos oncogênicos da via do AKT nos cânceres humanos, dependem de sua habilidade em induzirem a progressão e crescimento celular. A desregulação desta via leva a uma fosforilação elevada de todos os elementos da via do AKT (Bellacosa et al.,1998; Osaki et al., 2004).

O AKT possui dois sítios de fosforilação, o primeiro localizado na Treonina 308 e o segundo na Serina 473 e sua ativação é completa quando os dois sítios forem fosforilados (Osaki et al.,2004). Lin et al. (2005), obtiveram uma frequência de 80,9% e 34,8% em relação a fosforilação do AKT(T308) e AKT(S473), respectivamente, demonstrando uma relação entre a fosforilação dos dois sítios de AKT e a agressividade tumoral no câncer de mama. Estes dados vão de encontro aos nossos resultados, onde obtivemos 90% de AKT (T308) e 36,7% de AKT (S473) fosforilados nos casos controle e quando os dois sítios de AKT estavam fosforilados

obtivemos uma redução de 4EBP1 em 88,9% em nossas amostras, demonstrando uma ação efetiva da rapamicina quando o AKT está completamente ativado.

Em nosso estudo a taxa de redução de mTOR foi 23,3%, o que demonstra que, embora seja o alvo terapêutico da rapamicina, apresenta-se expresso em células sensíveis e resistentes a rapamicina, não podendo ser usado como um marcador de sensibilidade ao medicamento (Yu et al.,2001;Noh et al.,2004; Noh et al 2007).

Obtivemos uma diminuição de 4EBP1 em 60% de nossas amostras, demonstrando uma diminuição a nível de tradução e transcrição celular. Yu et al.(2001) sugeriram que as mudanças de fosforilação de 4EBP1 são importantes para se avaliar o efeito biológico da rapamicina, demonstrando que a inibição da fosforilação deste elemento depende da concentração utilizada e está relacionada aos inibidores do mTOR. A relação entre 4EBP1 e eIF4E é importante para o controle da síntese e tradução protéica. Enquanto a forma hipofosforilada de 4EBP1 se liga com alta afinidade à proteína eIF4E, sua forma hiperfosforilada previne esta interação. A proteína 4EBP1 apresenta sete sítios passíveis de fosforilação. Nestes sítios a fosforilação ocorre de maneira hierárquica e a liberação completa de eIF4E só ocorre após a fosforilação do último resíduo disponível (Gingras et al.,2001; Hay e Sonenberg,2004). Alguns estudos indicaram que a expressão do 4EBP1 pode estar relacionado ao mau prognóstico e a superexpressão de ErbB-2 (Zhou et al., 2004; Rojo et al., 2007), em nosso estudo não encontramos esta relação.

A expressão de eIF4G (controle) acompanhou a de 4EBP1 (controle) na grande maioria dos casos, demonstrando haver uma manutenção da tradução protéica em tumores que apresentaram-se expressos para AKT. Quando 4EBP1 se encontra hipofosforilado e ligado a eIF4E, ele não pode se ligar a eIF4G e consequentemente o complexo eIF4F não é formado. mTOR controla a tradução ao induzir a fosforilação de 4EBP1, promovendo seu desligamento de eIF4E e a fosforilação de eIF4G (Hay e Sonenberg,2004). A proteína mTOR está relacionada à indução de fosforilação de eIF4G e a inibição de sua atividade por ação da rapamicina promove sua desfosforilação (Raught et al.,2000).

Peng et al.(2002) e Shapira et al.(2006), fizeram uma comparação entre a inibição da fosforilação de 4EBP1 e S6K1 e a mudança da expressão gênica e a taxa de proliferação celular, respectivamente, demonstrando que a inibição de S6K1 e 4EBP1 ocorre em um tempo menor do que os outros dois fatores analisados. Isto poderia ser explicado pela parada na fase G1 do ciclo celular provocado pela rapamicina, que promove a inibição da proliferação celular a um nível muito inicial, não afetando portanto a diminuição do número de células (Shapira et al.,2006).

Quanto ao S6K1, observamos uma taxa de redução de 33,3%, não demonstrando ser um elemento importante para fins de verificação de ação a rapamicina em nosso modelo, embora alguns autores descrevam haver uma relação entre ativação de AKT e S6K1 e consequentemente resposta a rapamicina ou mesmo como um marcador em estudos clínicos (Peralba et al.,2003; Noh et al.,2004; Noh et al.,2007).

O grau de diminuição da expressão de 4EBP1 dos casos controles em relação aos tratados com rapamicina foram comparados aos seguintes fatores: receptores hormonais, expressão de ErbB-2 e p53. Do total de casos ErbB-2 negativos houve uma diminuição do grau de expressão de 4EBP1 após tratamento com rapamicina em 47% dos casos, em relação aos casos ErbB-2 positivos essa diminuição foi de 76,9%. Linhagens celulares de mama que superexpressam ErbB-2 exibem AKT ativado e respondem melhor a rapamicina do que os tumores ErbB-2 negativos (Hermanto et al., 2001; Zhou et al., 2004; Tokunaga et al., 2006; Wang et al., 2006; Andre et al., 2008).

Nos casos p53 negativos, após tratamento com rapamicina houve uma diminuição do grau de expressão de 4EBP1 em 50% dos casos, em relação aos casos p53 positivos essa diminuição foi de 69%. A superexpressão de p53 está associada ao aumento da atividade do AKT. A degradação do p53 ocorre através da via do AKT e do Mdm2 (Vestey et al., 2005, Schmitz et al., 2006).

Em relação aos receptores hormonais não observamos esta relação e os receptores de estrógeno e progesterona apresentaram um comportamento semelhante no grupo ErbB-2 positivo e negativo, estes resultados vão de encontro com os estudos de Andre et al.(2008), que também não encontraram associação entre a via do AKT e receptores hormonais, segundo os autores esta associação deve ser feita com muito cuidado, pois somente o ER extranuclear interage com AKT.

Os tumores ErbB-2 positivos estão associados a ativação da via do AKT, (Tokunaga et al.,2006), sendo sensíveis aos inibidores do mTOR (Andre et al., 2008), em função disto na segunda parte de nosso estudo avaliamos a mudança da expressão gênica em tumores tratados em relação aos não tratados com rapamicina subdivididos em ErbB-2 positivos e ErbB-2 negativos.

A listagem dos genes que apresentaram expressão diferencial analisados nas fatias tratadas com rapamicina em relação aos casos controles se enquadraram principalmente nas seguintes funções biológicas: proliferação, metabolismo, proteólise, transdução de sinal, transcrição, transporte, biosíntese protéica, regulação da transcrição-dependente de DNA e regulação da transcrição-promoção da RNA polimerase. Poucos genes apresentaram uma expressão diferencial simultânea nos dois grupos, no entanto as classes funcionais dos genes afetados pela rapamicina foram as mesmas.

Dentre os poucos genes superexpressos na listagem ErbB-2 positivo temos o MTF1 (Metal Regulatory Transcription Factor1), DACH1 (Dachshund Homolg 1) que é um repressor da migração celular através da supressão da interleucina 8 (Wu et al.,2008) e DIP2A (Disco Interacting Protein 2 Homolog) que é um modulador da transcrição da família HOX . HOXB5 (Homeobox B5), que também apresenta-se superexpressado no grupo Erb-B2 negativo, está envolvido na morfogênese e proliferação das células tronco (Phinney et al., 2005), assim como SHH (Sonic Hedgehog), um dos ligantes da via “hedgehog ” que pertence a uma família com função

de proliferação das células tronco, desempenhando importante papel na renovação da glândula mamária, sendo induzidos por estrogênio (Katano et al., 2005; Koga et al., 2008) e MRS2L, uma proteína transportadora essencial na manutenção do complexo respiratório (Piscacek, 2008). Além destes, o gene RORA (RAR-Related Orphan Receptor A), que regula o controle do metabolismo lipídico, GLP2R (Glucagon Like Peptide 2 Receptor) que estimula a secreção do hormônio glucagon associado com a quebra de triglicerídeos e IQGAP1 (IQ Motif Containing GTPase Activity Protein), também estavam superexpressos.

O perfil da expressão gênica dos tumores tratados com rapamicina revelaram uma forte resposta transcricional levando a inibição da tradução em múltiplos níveis pela repressão da síntese de proteínas ribossômicas mitocondriais, MRPS30 (Mitochondrial Ribosomal Protein S30), MRPL37 (Mitochondrial Ribosomal Protein L37), alterando a transcrição dos promotores da RNA polimerase II, CREG1 (Cellular Repressor of E1A-Stimulated Genes 1), KLF-7 (Kruppel Like Factor-7) e fatores de alongamento envolvidos na tradução -TSFM (Translation Elongation Factor Mitochondrial). A inibição da proteína mTOR por deprivação nutricional ou rapamicina leva a uma sub-regulação da transcrição da proteína ribossomal polimerase II no RNAm e de polimerase I e III no RNAt e RNAr, respectivamente. As três RNA polimerases estão envolvidas na biogênese ribossomal (Warner, 1999; Inoki et al., 2005).

Houve uma diminuição da expressão do fator de iniciação eucariótico traducional -EIF4B (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B), que é uma

subunidade do complexo eIF4F. Os múltiplos fatores da tradução estão envolvidos na iniciação da tradução. O complexo eIF4F consiste de eIF4E, eIF4G e EIF4A, sendo que eIF4B estimula a atividade de eIF4F potencializando a atividade helicase de eIF4A e interagindo com eIF3. A interação entre eIF4B e eIF3 está relacionada ao aumento da taxa de tradução em células que apresentam eIF4B fosforilados. As duas vias de sinalização mais importantes (Ras-MAPK e AKT/PI3K/mTOR) que estimulam a tradução pelo aumento de fatores de iniciação traducional e de alongamento e que levam a biogênese ribossomal convergem para eIF4B. Sua sub-regulação indica um enfraquecimento da tradução de proteínas cap dependentes (a estrutura 5' de todos os RNAs transcritos no núcleo da célula possui esta estrutura cap) (Hay and Sonenberg, 2004; Shahbazian et al., 2006).

Dentre outros genes sub-expressos no grupo ErbB-2 negativo, GTF2E2 (General Transcription Factor II E Polypeptide2), também conhecido como TF2E2, codifica uma proteína que contém duas subunidades, TFIIEx e TFIIEx que juntamente com a RNA polimerase II irão realizar a iniciação da transcrição (Sumimoto et al., 1991). Ele está também envolvido na carcinogênese mamária (Imbert et al., 1996).

O gene KHSRP (KH-Type Splicing Regulatory Protein), implicado na expulsão de RNAs para o exosoma, assim como CDYL (Chromodomain-Protein Y-Like) que reprime a transcrição também estavam sub-expressos.

Os membros da família dos fatores transcricionais GATA (GATA4 e GATAD2B) que desempenham importante papel na especificação e

diferenciação de múltiplos tipos celulares também estavam sub-expressos. Os fatores de transcrição, GATA-Type Zn Fingers (GATA- dedos de zinco), foram descritos inicialmente como responsáveis pela transcrição de genes catabólitos nitrogenados em *Saccharomyces cerevisiae* (Kulkarni et al., 2006). Os membros da família dos fatores transcrpcionais, GATA, são retidos no citoplasma ligados a proteína de retenção Ure2p, a qual é fosforilada por TOR, promovendo a transcrição protéica. A rapamicina induz a desfosforilação de Ure2p e a conseqüente liberação do fator transcricional da família GATA, translocando-o para o núcleo e inibindo sua atividade (Inoki et al.,2005).

Diversos reguladores da transcrição pertencentes à família dedos de zinco (Zn Finger) como, ZMYND11e ZnF134 pertencentes ao grupo ErbB-2 positivo apresentaram-se sub-expressos e no grupo ErbB-2 negativo, ZnF91 e RNF130 apresentaram-se superexpressos e ZBTB11 apresentou-se sub-expresso. TOR inibe a transcrição de genes relacionados a esta família através do sequestramento de fatores transcrpcionais pertencentes a elas no citoplasma (Inoki et al.,2005).

A rapamicina afetou genes envolvidos na taxa de síntese de purina, DNA e síntese protéica como, PPAT (Phosphorybosil Pyrosphosphate Transferase), que é um transportador de glutamina e SLC25A13, carregador de aspartato-glutamina, promovendo uma diminuição do transporte de aminoácidos, assim como genes associados a lipídeos e metabolismo, SLC27A3 (Solute Carrier Family 27 Member 3), LYCAT (Lysocardiolipin Acyl Transferase), PC (Pyruvate Carboxylase), implicado nas síntese do ácido

cítrico e DHRS1 (Dehydrogenas Redutase Member 1). A perda dos transportadores e das enzimas metabólicas podem resultar em uma diminuição de metabólitos bioenergéticos.

Houve também uma sub-expressão de API5 (Apoptosis Inhibitor), um gene anti-apoptótico (Morris et al.,2006) e genes codificados por diversos receptores hormonais como, CHRM1 (Cholinergic Receptor), NR3C2 (Mineralocorticoid Receptor), SCARB1 (Collagen/Trombospondin Receptor Like), OR10K1 (Olfactory Receptor Family 10), NR3C2 (Nuclear Receptor Subfamily 3,Group C,Member 2) e superexpressão do GLP2R (Glucagon Like Peptide 2 Receptor).

O gene EXT1(Exostoses) apresentou-se sub-expresso no grupo ErbB-2 positivo. Este gene está envolvido na biosíntese da heparan sulfato que está envolvida em diversos aspectos da biologia do câncer como, progressão tumoral, angiogênese e metástase. A inativação epigenética do EXT1 leva a uma diminuição na síntese de heparan sulfato no processo de progressão tumoral (Ropero et al.,2004).

O gene WWOX (WW Domain Containing Oxidoreductase), também sub-expresso no grupo ErbB-2 positivo se comporta como um gene supressor de tumor encontrado em diversos tumores incluindo o tumor de mama. A expressão gênica de WWOX está diretamente associada com prognóstico e metabolismo hormonal, localizando-se no cromossomo 16q23.3-24.1, a qual é uma região cromossômica fortemente envolvida com a perda de heterozigose em carcinoma de mama, estando presente

principalmente em tecidos tumorais hormonais positivos (Guler et al., 2004; Płuciennik et al., 2006).

Peng et al. (2002), realizaram análise por “microarray” em linhagens celulares tratadas com rapamicina e observaram mudança na expressão de genes relacionados a síntese protéica e ao metabolismo em relação aos casos controles. Os genes afetados indicam que a rapamicina induz a promoção do catabolismo de nutrientes para produção de energia. Existe uma similaridade entre as categorias dos genes afetados pela rapamicina em leveduras e mamíferos. Em ambos organismos ocorre uma diminuição do nível de genes envolvidos na glicólise, iniciação da tradução e alongamento e síntese de RNAt (Peng et al., 2002). Em nosso estudo observamos que os genes diferencialmente expressos nas duas categorias estudadas (ErbB-2 positivos e negativos), embora diferentes em sua grande maioria, possuem uma manutenção de suas funções, estando classificados nas categorias funcionais semelhantes as descritas por Peng et al. (2002).

Peng et al. (2002) compararam a mudança do perfil gênico de linhagens tratadas com rapamicina e linhagens submetidas a um estado de privação nutricional e concluíram que os genes afetados foram semelhantes. Sob situações de privação nutricional alteram-se as características fenotípicas responsáveis pela síntese protéica provocando sua redução, assim como uma mudança no perfil gênico. A proteína TOR altera a expressão de genes relacionados à privação nutricional, inibindo diversos fatores transcricionais retendo-os no citoplasma. Em nosso estudo,

observamos que a grande maioria dos genes alterados relacionaram-se principalmente com a transcrição celular.

Conclusão

6 Conclusão

A análise dos resultados nos permitiu as seguintes conclusões:

- 1) Foi possível manter a viabilidade celular em tecidos tumorais mantidos em cultura de órgão. Esta viabilidade pode ser constatada em nosso estudo, onde através da análise imunoistoquímica pudemos verificar a presença de eIF4G, que é uma proteína importante para a formação do complexo eIF4F que juntamente com outros fatores da iniciação da tradução permitem que a informação contida no RNAm seja transformada num polipeptídeo.
- 2) Houve uma ação efetiva da rapamicina nas fatias de tecidos tumorais mantidos em cultura de órgão através da diminuição de 4EBP1 em 60% dos casos, nos permitindo concluir que a rapamicina atuou em mecanismos a nível muito inicial da proliferação celular.
- 3) mTOR é uma proteína que mantém suas funções de leveduras a mamíferos, estando envolvida no controle do crescimento celular, regulando diversos processos essenciais para sobrevivência tais como, transcrição, tradução e biogênese ribossomal. Em situações de privação nutricional ocorre uma alteração do perfil gênico que inibe a síntese protéica. Em situações de abundância de nutrientes, a proteína mTOR tem a capacidade de “sentir” a presença destes aminiácidos, adaptando-se através da alteração do perfil de genes ligados ao metabolismo e transporte, concluindo-se que esta proteína é essencial para sobrevivência celular através principalmente da regulação dos

fatores de transcrição (transcrição gênica) de acordo com a necessidade celular.

Bibliografia

Bibliografia

ADRIANCE MC, INMAN JL, PETERSEN OW, BISSELL MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. **Breast Cancer Res.** 2005; 7(5): 190-7.

ANDRE F, NAHTA R, CONFORTI R, BOULET T, AZIZ M, YUAN LX, MESLIN F, SPIELMANN M, TOMASIC G, PUSZTAI L, HORTOBAGYI GN, MICHIELS S, DELALOGUE S, ESTEVA FJ. Expression patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer. **Ann Oncol.** 2008; 19(2): 315-20.

ATKINS MB, HIDALGO M, STADLER WM, LOGAN TF, DUTCHER JP, HUDES GR, PARK Y, LION SH, MARSHALL B, BONI JP, DUKART G, SHERMAN ML. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. **J Clin Oncol.** 2004; 22(5): 909-18.

BECKMANN M W, NIEDERACHER D, SCHNÜRCH H G , GUSTERSON B A, BENDER H G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. **J Mol Med.** 1997; 75(6): 429-39.

BELLACOSA A, TESTA JR, STAAL SP, TSICHLIS PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. **Science** 1991; 254(5029): 274-277.

BELLACOSA A, CHAN TO, AHMED NN, DATTA K, MALSTROM S, STOKOE D, MCCOMICK F, FENG J, TSICHLIS PN. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. **Oncogene.** 1998; 17(3): 313-25.

BHASKAR PT, HAY N. The two TORCs and AKT. **Dev Cell**. 2007; 12(4): 487-502.

BISSELL MJ, RADISKY DC, RIZKI A, WEAVER VM, PETERSEN OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation**. 2002; 70(9-10): 537-46.

BJORNSTI MA, HOUGHTON PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. 2004; 4(5): 335-48.

BLOMMAART EF, LUIKEN JJ, BLOMMAART PJ, VAN WOERKOM GM, MEIJER AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. **J Biol Chem**. 1995; 270(5): 2320-6.

BOULAY A, ZUMSTEIN-MECKER S, STEPHAN C, BEUVINK I, ZILBERMANN F, HALLER R, TOBLER S, HEUSSER C, O'REILLY T, STOLZ B, MARTI A, THOMAS G, LANE HA. Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. **Cancer Res**. 2004; 64(1): 252-61.

BROWN EJ, BEAL PA, KEITH CT, CHEN J, SHIN TB, SCHREIBER SL. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. **Nature**. 1995; 377(6548): 441-6.

BURDALL SE, HANBY AM, LANSDOWN MR, SPEIRS V. Breast cancer cell lines: friend or foe?. **Breast Cancer Res**. 2003; 5(2): 89-95.

CAILLEAU R, YOUNG R, OLIVE M, REEVES WJ JR. Breast tumour cell lines from pleural effusions. **J Natl Cancer Inst** .1974; 53: 661-674.

CAILLEAU R, OLIVE M, CRUCIGER QV: Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. **In Vitro**. 1978; 14: 911-915.

CAMPBELL RA, BHAT-NAKSHATRI P, PATEL NM, CONSTANTINIDOU D, ALI S, NAKSHATRI H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. **J Biol Chem**. 2001; 276(13): 9817-24.

CARRAWAY H, HIDALGO M. New targets for therapy in breast cancer: mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists. **Breast Cancer Res**. 2004; 6(5): 219-24.

CASTEDO M, FERRI KF, KROEMER G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro and anti-apoptotic. **Cell Death and Differentiation**. 2002; 9(2): 99-100.

CERIANI RL, CONTESSO GP, NATAF BM. Hormone requirement for growth and differentiation of the human mammary gland in organ culture. **Cancer Research**. 1972; 32: 2190-96.

CHAN S, SCHEULEN M E, JOHNSTON S, MROSS K, CARDOSO F, DIITTRICH C, EIERMANN W, HESS D, MORANT R, SEMIGLAZOV V, BORNER M, SALZBERG M, OSTAPENKO V, ILLIGER H, BEHRINGER D, BARDY-BOUXIN N, BONI J, KONG S, CINCOTTA M, MOORE L. Phase II study of Temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**. 2005; 23(23): 5314-22.

CHANG SB, MIRON P, MIRON A, IGLEHART JD. Rapamycin inhibits proliferation of estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **J Surg Res**. 2007; 138(1): 37-44.

CHAWLA SP, TOLCHER SP, STADDON AP, D'AMATO ,BLAY JY, LOEWY J, KAN R, DEMETRI GD. Survival results with AP23573, a novel mTOR inhibitor, in patients (pts) with advanced soft tissue or bone sarcomas: Update of phase II trial. **J Clin Oncol**. 2007; 25(18S): 10076.

CHIU MI, KATZ H, BERLIN V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1994; 91(26): 12574-8.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**. 1987; 162(1): 156-9.

CREIGHTON CJ. A gene transcription signature of the AKT/mTOR pathway in clinical breast tumors. **Oncogene**.2007; 26: 4648-55.

CRESPO JL, HALL MN. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2002; 66(4): 579-91.

CULLY M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**.2006; 6(3): 184-192.

DANCEY J, SAUSVILLE EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. **Nat Rev Drug Discov**. 2003; 2(4): 296-313.

DEGRAFFENRIED LA, FRIEDRICHS WE, RUSSELL DH, DONZIS EJ, MIDDLETON AK, SILVA JM, ROTH RA, HIDALGO. M. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. **Clin Cancer Res**. 2004; 10(23): 8059-67.

DILLING MB, DIAS P, SHAPIRO DN, GERMAIN GS, JOHNSON RK, HOUGHTON PJ. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. **Cancer Res.** 1994; 54(4): 903-7.

DILLON RL, WHITE DE, MULLER WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase network: implications for human breast cancer. **Oncogene.** 2007; 26(9): 1338- 45.

DRIFE JO. Breast development in puberty. **Ann N Y Acad Sci.**1986; 464: 58-65.

DUMONT FJ, STARUCH MJ, KOPRAK SL, MELINO MR, SIGAL NH. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. **J Immunol.** 1990 ;144(1): 251-8.

EIGELIENE N, HÄRKÖNEN P, ERKKOLA R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. **BMC Cancer.** 2006; 6:246.

ENGEL LW, YOUNG NA, TRALKA TS, LIPPMAN ME, O'BRIEN SJ, JOYCE MB. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. **Cancer Res.** 1978; 38: 3352-64.

ENGELMAN JA, LUO J, CANTLEY LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature.** 2006; 7(8): 606-19.

FAIVRE S, KROEMER G, RAYMOND E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. **Nat Rev Drug Discov.** 2006; 5(8): 671-88.

FEILOTTER HE, COULON V, MCVEIGH JL, BOAG AH, DORION-BONNET F, DUBOUÉ B, LATHAM WC, ENG C, MULLIGAN LM, LONGY M. Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. **Br J Cancer**. 1999; 79(5-6): 718-23.

FRESNO VARA JA, CASADO E, DE CASTRO J , CEJAS P, BELDA-INIESTA C, GONZÁLEZ-BARÓN M. PI3K/AKT signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev**. 2004; 30(2): 193-204.

FINGAR DC, BLENIS J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene**. 2004; 23(18): 3151-71.

FUCITO A, LUCCHETTI C, GIORDANO A, ROMANO G. Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: what are the perspectives for clinical practice?. **Int J Biochem Cell Biol**. 2008; 40(4): 565-75.

GIBBONS JJ, DICAFAI C, PETERSON R, HERNANDEZ R, SKOTNICKI J, FROST J. **J Proc Am Assoc Cancer Res**. 2000; 40: 301.

GINGRAS A C, RAUGHT B, SONENBERG N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev**. 2001; 15(7): 807-26.

GULER G, UNER A, GULER N, HAN SY, ILIOPOULOS D, HAUCK WW, MCCUE P, HUEBNER K. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. **Cancer**. 2004; 100(8): 1605-14.

GREWE M, GANSAUGE F, SCHIMD RM, ADLER G, SEUFFERLEIN T. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p-70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. **Cancer Res**. 1999; 59(15): 3581-7.

GROBSTEIN C. Mechanisms of organogenetic tissue interaction. **Natl Cancer Inst Monogr**. 1967; 26: 279-99.

HANAHAN D, WEINBERG R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. 2000; 100(1): 57-70.

HANKS SK, QUINN AM, HUNTER T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**. 1988; 241(4861): 42-52.

HANSEN RK, BISSELL MJ. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. **Endocr Relat Cancer**. 2000; 7(2): 95-113.

HARRINGTON LS, FINDLAY GM, LAMB RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. **Trends Biochem. Sci**. 2005; 30(1): 35-42.

HASHEMOLHOSSEINI S, NAGAMINE Y, MORLEY SJ, DESRIVIÈRES S, MERCEP L, FERRARI S. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. **J Biol Chem**. 1998; 273(23): 14424-9.

HAY N, SONNENBERG N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**. 2004; 18: 1926-45.

HAY N. The AKT-mTOR tango and its relevance to cancer. **Cancer Cell**. 2005; 8: 179-83.

HENNESSY BT, SMITH DL, RAM PT, LU Y, MILLS GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nature**. 2005; 4(12): 988-1002.

HERMANTO U, ZONG CS, WANG LH. ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the

phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth. **Oncogene**. 2001; 20(51): 7551-62.

HIDALGO M, ROWINSKY EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. **Oncogene**. 2000; 19(56): 6680-6.

HIDALGO M, ROWINSKY E, ERLICHMAN C, DREGLER R, MARSHALL B, MARKS R, EDWARDS T, BONI J, DUKART G, BUCKNER J. CCI-779, a rapamycin analog and multifaceted inhibitor of signal transduction: a phase I study. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.** 19, 187a, 2000.

HIDALGO, M. New target, new drug, old paradigm. **J Clin Oncol.** 2004; 22(12): 2270-72.

HILLMAN EA, VALERIO MG, HALTER SA, BARRET-BOONE LA, TRUMP BF. Long-term explants culture of mammary epithelium. *Cancer Res.* 1983;43:245-57.

HSIEH AC, MOASSER MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target ERBB-3. **British J of Cancer**. 2007; 97(4): 453-57.

HUANG S, HOUGHTON PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. **Curr Opin Pharmacol** .2003; 3(4): 371-77.

HUDES G, CARDUCCI M, TOMCZAAK P, DUTCHER J, FIGLIN R, KAPOOR A, STAROSLAWSKA E, O' TOOLE T, KONG S, MOORE L. A phase 3, randomised, 3-arm study of temsirolimus (TEMSR) or interferon- α (IFN) or the combination of TEMSR + IFR in the treatment of firstline,poor-risk patients with advanced renal cell carcinoma. **J. Clin. Oncol.**2006; 24(18S): Abs. LBA4.

HYNES EN, BOULAY A. The mTOR pathway in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 2006; 11(1): 53-61.

IMBERT A, CHAFFANET M, ESSIUX L, NOGUCHI T, ADÉLAÏDE J, KERANGUEVEN F, LE PASLIER D, BONAÏTI-PELLIÉ C, SOBOL H, BIRNBAUM D, PÉBUSQUE MJ. Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and Werner syndrome. **Genomics**.1996; 32(1): 29-38.

INOKI K, ZHU T, GUAN K L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**. 2003; 115(5): 577- 90.

INOKI K, OUYANG H, LI Y, GUAN KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2005; 69(1): 79-100.

INOKI K, GUAN KL. Complexity of the TOR signaling network. **Trends Cell Biol**. 2006; 16(4): 206-12.

JACINTO E, FACCHINETTI V, LIU D, SOTO N, WEI S, JUNG SY, HUANG Q, QIN J, SU B. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. **Cell**. 2006; 127(1): 125-37.

JANUS A, ROBAK T, SMOLEWSKI P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy. **Cell Mol Biol Lett**. 2005;10(3):479-98.

JONES PF, JAKUBOWICZ T , PITOSI FJ, MAURER F , HEMMINGS BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of second-messenger subfamily. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1991; 88(10): 4171-75.

KANG S, BADER AG, ZHAO L, VOGT PK. Mutated PI-3Kinases.Cancer targets on a silver platter. **Cell Cycle**. 2005; 4(4): 578-81.

KATANO M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. **Cancer Lett.** 2005; 227(2): 99-104.

KEYDAR I, CHEN L, KARBY S, WEISS FR, DELAREA J, RADU M, CHAITCIK S, BRENNER HJ. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. **Eur J Cancer.** 1979, 15: 659-370.

KINO T, INAMURA N, SAKAI F, NAKAHARA K, GOTO T, OKUHARA M, AOKI H, OCHIAI T. Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. **Transplant Proc.** 1987; 19(5 Suppl 6): 36-9.

KOGA K, NAKAMURA M, NAKASHIMA H, AKIYOSHI T, KUBO M, SATO N, KUROKI S, NOMURA M, TANAKA M, KATANO M. Novel link between estrogen receptor alpha and hedgehog pathway in breast cancer. **Anticancer Res.** 2008; 28(2A): 731-40.

KRUMDIECK CL, DOS SANTOS JE, HO KJ. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. **Anal Biochem.** 1980; 104(1): 118-23.

KULKARNI A, BUFORD TD, RAI R, COOPER TG. Differing responses of Gat1 and Gln3 phosphorylation and localization to rapamycin and methionine sulfoximine treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** 2006; 6(2):218-29.

LIN HJ, HSIEH FC, SONG H, LIN J. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. **Br J Cancer.** 2005; 93(12): 1372-81.

LONG X, LIN Y, ORTIZ-VEGA S, YONEZAWA K, AVRUCH J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Curr Biol.** 2005; 15(8): 702-13.

MATOSKA J, STRICKER F. Following human tumors in primary organ culture. **Neoplasma**. 1967; 14: 507-19.

MAYO L, DONNER DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2001; 98(20): 11598-603.

MELO J, BARNES DJ. Switching off oncogenic signals in chronic myeloid leukaemia. **Hematol J**. 2004; 5 Suppl 3: S183-7.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – INCA-Comprev. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, 2008. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2008/index.html> > **acesso em: 28 de junho de 2008.**

MITA MM, MITA A, ROWINSKY EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. **Cancer Biol Ther**. 2003; 2(4 Suppl 1): S169-177.

MITA MM, ROWINSKY EK, GOLDSTON ML, MITA AC, CHU Q, SYED S, KNOWLES HL, RIVERA VM, BEDROSIAN CL, TOLCHER AW. Phase I, pharmacodynamic (PK), and (PD) study of AP23573, an mTOR Inhibitor, administered IV daily x 5 every other week in patients (pts) with refractory or advanced malignancies. **J Clin Oncol**. 2004; 22(14S): 3076.

MONDESIRE WH, JIAN W, ZHANG H, ENSOR J, HUANG MC, MILLS GB, MERIC-BERNSTAM F. Targeting mammalian of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. **Clin Cancer Res**. 2004; 10(20): 7031-42.

MORRIS RE, WU J, SHORTHOUSE RA. Study of the contrasting effects of cyclosporine, FK 506, and rapamycin on the suppression of allograft rejection. **Transplant Proc.** 1990; 22(4): 1638-41.

MORRIS EJ, MICHAUD WA, JI JY, MOON NS, ROCCO JW, DYSON NJ. Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. **PLoS Genet.** 2006; 2(11): e196.

NAIDU R, YADAV M, NAIR S, KUTTY MK. Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. **Br J Cancer.** 1998; 78(10): 1385-90.

NAMBA R, YOUNG LJ, ABBEY CK, KIM L, DAMONTE P, BOROWSKY AD, QI J, TEPPER CG, MACLEOD CL, CARDIFF RD, GREGG JP. Rapamycin inhibits growth of premalignant and malignant mammary lesions in a mouse model of ductal carcinoma in situ. **Clin Cancer Res.** 2006; 12(8): 2613-21.

NKONDJOCK A, GHADIRIAN P. Risk factors and risk reduction of breast cancer. **Med Sci (Paris).** 2005; 21(2): 175-80.

NOH WC, MONDESIRE WH, PENG J, JIAN W, ZHANG H, DONG J, MILLS GB, HUNG MC, MERIC-BERNSTAM F. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. **Clin Cancer Res.** 2004; 10(3): 1013-23.

NOH WC, KIM YH, KIM MS, KOH JS, KIM HA, MOON NM, PAIK NS. Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinicopathologic variables. **Breast Cancer Res Treat.** 2007.

O'DONNELL, A. A phase I study of the oral mTOR inhibitor RAD001 as monotherapy to identify the optimal biologically effective dose using toxicity, pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) endpoints in patients with solid tumors. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.** 22, 200, 2003.

OGAWA T, TOKUDA M, TOMIZAWA K, MATSUI H, KONISHI R, NAGAHATA S, HATASE O. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/18) cells. **Biochem Biophys Res Commun.**1998; 249(1): 226-30.

OLAYIOYE MA, NEVE RM, LANE HA, HYNES NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J.** 2000; 19(13): 3159-67.

OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-AKT pathway: Its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis.** 2004; 9(6): 667-76.

OSBORNE CK, HOBBS K, TRENT JM. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. **Breast Cancer Res Treat.** 1987; 9(2): 111-21.

OZA A M, ELIT L, BIAGI J, CHAPMAN W, TSAO M, HEDLEY D, HANSEN C, DANCEY J, EISENHAUER E. A phase II study of temsirolimus (CCI-779) in patients with metastatic and/or locally recurrent endometrial cancer. Proc. 17th Symp. **J Clin Oncol.**2006; 24(18S): 3003.

OZZELLO L, SORDAT B, MERENDA C, CARREL S, HURLIMANN J, MACH JP. Transplantation of a human mammary carcinoma cell line (BT20) into nude mice. **J Natl Cancer Inst.** 1974; 52: 1669-1672.

PENG T, GOLUB TR, SABATINI DM. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. **Mol Cell Biol.** 2002; 22(15): 5575-84.

PERALBA JM, DEGRAFFENRIED L, FRIEDRICHS W, FULCHER L, GRÜNWARD V, WEISS G, HIDALGO M. Pharmacodynamic Evaluation of

CCI-779, an Inhibitor of mTOR, in Cancer Patients. **Clin Cancer Res.** 2003; 9(8): 2887-92.

PETERSON RT, BEAL PA, COMB MJ, SCHREIBER SL. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. **J.Biol. Chem.** 2000; 275: 7416–23.

PHINNEY DG, GRAY AJ, HILL K, PANDEY A. Murine mesenchymal and embryonic stem cells express a similar Hox gene profile. **Biochem Biophys Res Commun.** 2005; 338(4): 1759-65.

PISKACEK M, ZOTOVA L, ZSURKA G, SCHWEYEN RJ. Conditional knock-down of hMRS2 results in loss of mitochondrial Mg(2+) uptake and cell death. **Cell Mol Med.** 2008.

PŁUCIENNIK E, KUSIŃSKA R, POTEMSKI P, KUBIAK R, KORDEK R, BEDNAREK AK. WWOX--the FRA16D cancer gene: expression correlation with breast cancer progression and prognosis. **Eur J Surg Oncol.** 2006; 32(2): 153-7.

RAUGHT B, GINGRAS AC, GYGI SP, IMATAKA H, MORINO S, GRADI A, AEBERSOLD R, SONENBERG N. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G1. **EMBO J.** 2000; 19(3): 434-44.

RAYMOND E, ALEXANDRE J, FAIVRE S, VERA K, MATERMAN E, BONI J, LEISTER C, KORTH-BRADLEY J, HANAUSKE A, ARMAND JP. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. **J. Clin. Oncol.** 2004; 22(12): 2336-47.

RAZANDI M, PEDRAM A, PARK ST, LEVIN ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. **J Biol Chem.** 2003; 278(4): 2701-12.

ROHDE J, HEITMAN J, CARDENAS ME. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. **J Biol Chem.** 2001; 276(13): 9583-6.

ROJO F, NAJERA L, LIROLA J, JIMÉNEZ J, GUZMÁN M, SABADELL MD, BASELGA J, RAMON Y CAJAL S. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. **Clin Cancer Res.** 2007; 13(1): 81-9.

RØNNOV-JESSEN L, PETERSEN OW, BISSELL MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiol Rev.** 1996; 76(1): 69-125.

ROPERO S, ETIEN F, ESPADA J, FRAGA M F, HERRANZ M, ASP J, BENASSI M S, FRANCHI A, PATIÑO A, WARD L S, BOVEE J, CIGUDOSA J C, WIN W, ESTELLER M. Epigenetic loss of familial tumor-suppressor gene exostosin-1(EXT1) disrupts heparin sulfate synthesis in cancer cells. **Hum Mol Genet.** 2004; 13(22): 2753-65.

ROSENWALD IB, KASPAR R, ROUSSEAU D, GEHRKE L, LEBOULCH P, CHEN JJ, SCHMIDT EV, SONENBERG N, LONDON IM. Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. **J Biol Chem.** 1995; 270(36): 21176-80.

SABATINI DM, PIERCHALA BA, BARROW RK, SCHELL MJ, SNYDER SH. The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity. **J Biol Chem.** 1995; 270(36): 20875-8.

SABERS CJ, MARTIN MM, BRUNN GJ, WILLIAMS JM, DUMONT FJ, WIEDERRECHT G, ABRAHAM RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. **J Biol Chem.** 1995; 270(2):815-22.

SARBASSOV DD, ALI SM, KIM DH, GUERTIN DA, LATEK RR, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, SABATINI DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol.** 2004; 14: 1296-302.

SARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM, SABATINI DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science.** 2005; 307(5712): 1098-101.

SCHIFF R, MASSARWEH SA, SHOU J, BHARWANI L, ARPINO G, RIMAWI M, OSBORNE CK. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptors coregulators. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2005; 56(Suppl1): 10-20.

SEHGAL SN, BAKER H, VÉZINA C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. **J Antibiot (Tokyo).** 1975; 28(10): 727-32.

SEHGAL SN. Sirolimus: Its Discovery, biological Properties, and Mechanism of Action. **Transplantations Proceedings.** 2003; 35(Suppl 3A): 7S-14S.

SEUFFERLEIN T, ROZENGURT E. Rapamycin inhibits constitutive p70s6K phosphorylation, cell proliferation and colony formation in small lung cancer cells. **Cancer Res.** 1996; 56(17): 3895-7.

SHAH SA, POTTER MW, RICCIARDI R, PERUGINI RA, CALLERY MP. Frap –p70s6K signaling is required in pancreatic cell proliferation. **J Surg Res.**2001; 97(2): 123-30.

SHAHBAZIAN D, ROUX PP, MIEULET V, COHEN MS, RAUGHT B, TAUNTON J, HERSHEY JWB, BLENIS J, PENDE M, SONENBERG N. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. **Embo J.**2006; 25: 2781-91.

SHAMJI AF, NGHIEM P, SCHREIBER SL. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. **Mol Cell.** 2003;12(2): 271-80.

SHAPIRA M, KAKIASHVILI E, ROSENBERG T, HERSHKO DD. The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit SKp2 in breast cancer cells. **Breast Cancer Research.** 2006; 8(4): 1-9.

SHIGEMITSU K, TSUJISHITA Y, HARA K, NANAHOSE M, AVRUCH J, YONEZAWA K. Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. Possible involvement of autophagy in cultured hepatoma cells. **J Biol Chem.** 1999; 274(2): 1058-65.

SCHMITZ KJ, GRABELLUS F, CALLIES R, WOHLSCHLAEGER J, OTTERBACH F, KIMMIG R, LEVKAU B, SCHMID KW, BABA HA. Relationship and prognostic significance of phospho-(serine 166)-murine double minute 2 and Akt activation in node-negative breast cancer with regard to p53 expression. **Virchows Arch.** 2006; 448(1): 16-23.

SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with

amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**. 1987; 235(4785): 177-82.

SOULE HD, VASQUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**. 1973; 51: 1409-1413.

SOUSA JE, SOUSA AG, COSTA MA, ABIZAID AC, FERES F. Use of rapamycin-impregnated stents in coronary arteries. **Transplant Proc**. 2003; 35(3 Suppl): 165S-170S.

STAAL SP. Molecular cloning of the AKT oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary gastric adenocarcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** .1987;84(14):5034-37.

STAAL SP, HUEBNER K , CROCE CM , PARSA NZ, TESTA ,JR. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. **Genomics**. 1988.2(1): 96-98.

SUMIMATO H, OHKUMA Y, SINN E, KATO H, SHIMASAKI S, HORIKOSHI M, ROEDER RG. Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIE. **Nature**. 1991; 354(6352): 401-4.

TAKAHASHI T, HARA K, INOUE H, KAWA Y, TOKUNAGA C, HIDAYAT S, YOSHINO K, KURODA Y, YONEZAWA K. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. **Genes Cells**.2000;5(9): 765–75.

TESTA JR, BELLACOSA A. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2001; 98(20): 10983-85.

TOKUNAGA E, KIMURA Y, OKI E, UEDA N, FUTATSUGI M, MASHINO K, YAMAMOTO M, IKEBE M, KAKEJI Y, BABA H, MAEHARA Y. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. **Int J Cancer**. 2006; 118(2): 284-9.

TREMPE GL. Human breast cancer in culture. **Recent Results Cancer Res**. 1976; 57: 33-41.

TREPANIER DJ, GALLANT H, LEGATT DF, YATSCOFF RW. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. **Clin Biochem**. 1998; 31(5): 345-51.

TROWELL OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. **Exp Cell Res**. 1959; 16(1):118-47.

UNDÉN AB, SANDSTEDT B, BRUCE K, HEDBLAD M, STAHL-BÄCKDAHL M. Stromelysin-3 mRNA associated with myofibroblasts is overexpressed in aggressive basal cell carcinoma and in dermatofibroma but not in dermatofibrosarcoma. **J Invest Dermatol**. 1996; 107(2): 147-53.

VAN DER HOEVEN BL, PIRES NM, WARDA HM, OEMRAWSINGH PV, VAN VLIJMEN BJ, QUAX PH, SCHALIJ MJ, VAN DER WALL EE, JUKEMA JW. Drug-eluting stents: results, promises and problems. **Int J Cardiol**. 2005; 99(1): 9-17.

VAN DER KUIP H, MÜRDTER TE, SONNENBERG M, MCCLELLAN M, GUTZEIT S, GERTEIS A, SIMON W, FRITZ P, AULITZKY WE. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. **BMC Cancer**. 2006; 6(86): 1-11.

VANHAESEBROECK B , ALESSI D R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J**. 2000; 346 Pt3: 561-76.

VESTEY SB, SEN C, CALDER CJ, PERKS CM, PIGNATELLI M, WINTERS ZE. Activated Akt expression in breast cancer: correlation with p53, Hdm2 and patient outcome. **Eur J Cancer**. 2005; 41(7): 1017-25.

VEZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL SN. Rapamycin (AY-22,989) a new antifungal antibiotic. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **J. Antibiot.** (Tokyo).1975; 28: 721-6.

VON OOSTEROM A, REICHART P, BLAY J-Y, DUMEZ J, FLETCHER M, DEBIEC-RYCHTER M, SHAND N, DRIMITRIJEVIC S, YAP A, DEMETRI G. A phase I/II trial of the oral mTOR-inhibitor everolimus (E) and imatinib mesylate (IM) in patients (pts) with gastrointestinal stromal tumor (GIST) refractory to IM: Study update. **J Clin Oncol**.2005; 23(16S): 9033.

WANG SE, SHIN I, WU FY, FRIEDMAN DB, ARTEAGA CL. ErbB-2 signaling to Rac-1-Pak-1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor. **Cancer Res**. 2006; 66(19): 9591-600.

WARNER, JR .The economics of ribosome biosynthesis in yeast. **Trends Bioch Sci**.1999;24(11): 437-40.

WIEDERRECHT G, MARTIN MM, SIGAL NH, SIEKIERKA JJ. Isolation of a human cDNA encoding a 25 kDa FK-506 and rapamycin binding protein. **Biochem Biophys Res Commun**. 1992; 185(1): 298-303.

WITZIG TE, ANSELL SM, GEYER PJ, KURTIN PJ, ROWLAND KM, FLYNN P J, MORTON RF, DAKHIL SR, GROSS HM, MAURER MJ, KAUFMANN SH. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. **J. Clin. Oncol**.2005; 23: 5347–56.

WOLF C, ROUYER N, LUTZ Y, ADIDA C, LORIOT M, BELLOCQ JP, CHAMBON P, BASSET P. Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1993; 90(5): 1843-7.

WONG CW, MCNALLY C, NICKBARG E, KOMM BS, CHESKIS BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002; 99(23): 14783-8.

WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, HALL MN. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**. 2006; 124(3): 47184.

WU K, KATYAR S, LI A, LIU M, JU X, POPOV VM, JIAO X, LISANTI MP, CASOLA A, PESTELL RG. Dachshund inhibits oncogene-induced breast cancer cellular migration and invasion through suppression of interleukin-8. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008; 105(19): 6924-9.

YATSCOFF RW, ASPESLET LJ. The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. **Ther Drug Monit**. 1998; 20(5): 459-63.

YU K, TORAL-BARZA L, DISCAFANI C, ZHANG WG, SKOTNICKI J, FROST P, GIBBONS JJ. mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. **Endocr Relat Cancer**. 2001; 8(3): 249-58.

ZHANG Y, GAO X, SAUCEDO LJ, RU B, EDGAR BA, PAN, D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. **Nat. Cell Biol**. 2003; 5: 578–81.

ZHOU X, TAN M, STONE HAWTHORNE V, KLOS KS, LAN KH, YANG Y, YANG W, SMITH TL, SHI D, YU D. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB-2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. **Clin Cancer Res.**2004; 10(20): 6779-88.