

**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES PARA RISCO DE PROGRESSÃO DE
CARCINOMA DUCTAL DE MAMA**

CAROLINA SENS ABUÁZAR

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Abuázar, Carolina Sens

Identificação e validação de marcadores moleculares para risco de progressão de carcinoma ductal de mama / Carolina Sens Abuázar. São Paulo; 2012.

159p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. CARCINOMA DUCTAL DE MAMA. 2. NEOPLASIAS DA MAMA. 3. MARCADORES BIOLÓGICOS.

“O Jovem que deseja ser cientista e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente).”

Newton Freire-Maia

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Salete e Emir, e ao meu grande amor, Francisco Cariri. Vocês são as três pessoas mais importantes na minha vida e também merecem esta conquista!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, pelas boas conversas, críticas construtivas e incentivadas, que contribuíram muito para meu crescimento tanto profissional quanto pessoal.

Agradecimento especial em memória ao professor Dr. Ricardo Renzo Brentani, por todo incentivo à pesquisa no Hospital A.C. Camargo.

Ao auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2009/00669-2) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos os amigos e colegas do laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Câncer, Dr. Alex de Carvalho, Bianca Lisboa, Bruna Barros, Cristiane Gonçalves, Danielle Braggio, Dra. Elisa Napolitano, Eloisa Olivieri, Dr. Felipe Carneiro, Giovana Torrezan, Gustavo Molina, Louise Mota, Mabel Gigliola, Márcia Figueiredo, Mayra Castro, Roberto Ferreira, Solange Coelho, Dra. Tatiana Ricca. Aos antigos membros, Dra. Mariana Maschietto, Vera Priscinoti e Dr. Fábio Picole. Aos novos membros, Ana Paula Mitsue, Dra. Adriana Miti, Dra. Vanina Elias, Camila Pinello e Andrea Yagui.

À Dra. Elisa Napolitano e Ferreira, que me acompanhou em todas as etapas deste trabalho. Um agradecimento especial a outros membros do grupo que em algum momento participaram deste trabalho, Gustavo Molina, Dra. Tatiana Ricca, Dr. Alex de Carvalho, Dra. Mariana Maschietto e Louise Mota.

A todos os amigos do CIPE

Ao Biobanco do Hospital A.C. Camargo

Aos médicos do Departamento de Anatomia Patológica, em especial à Dra. Cynthia Osório.

À Dra. Ana Krepischi, à Dr. Isabela Werneck e ao Dr. Rafael Malagoli.

Aos funcionários do Hospital A.C Camargo, em especial aos meninos do arquivo, SAME, Carlinhos, Severino, Rômulo, Fátima, Simone. Agradecimento especial à Suely e Ivan, pela realização da imunoistoquímica.

Ao pessoal da biblioteca, especialmente à Suely. À pós-graduação do hospital, especialmente à Ana Kuninari.

A todos os amigos e familiares, que mesmo distantes, estiveram muito presentes ao longo destes quatro anos.

Aos meus pais, que com paciência compreenderam que eu estaria longe, mesmo quando precisaram muito de mim.

Ao grande companheiro Francisco Cariri. Você é tão merecedor desta conquista quanto eu.

A Deus!!

RESUMO

Abuazar CS. **Identificação e validação de marcadores moleculares para risco de progressão de carcinoma ductal de mama.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres e é responsável por uma alta taxa de mortalidade no mundo. Entre os tipos histológicos, o carcinoma ductal de mama (DC) é o mais frequente e pode se manifestar na forma *in situ* (DCIS) e/ou invasiva (IDC). O DCIS constitui um grupo heterogêneo de tumores com progressão variável, sendo de grande importância a procura de novos marcadores moleculares que possam prever o risco de progressão e que também contribuam para uma melhor avaliação prognóstica das pacientes. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, utilizando as metodologias de cDNA *microarray* e microdissecção a laser, o conceito de divergência molecular foi aplicado em grupos independentes de células epiteliais tumorais capturadas de amostras que mimetizam a progressão do câncer de mama [DCIS puro, componente *in situ* de lesão que coexiste com o componente ductal invasivo (DCIS-IDC) e ductal invasivo (IDC)]. Entre os diferentes grupos de células, foi observado um perfil mais distinto entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC, lesões que do ponto de vista histopatológico, apresentam a mesma morfologia. Por outro lado, foi encontrada maior similaridade molecular entre as células do componente *in situ* do DCIS-IDC e as células do IDC, sugerindo que as alterações moleculares ocorrem antes da manifestação do fenótipo invasivo (CASTRO et al. 2008). Desta forma, genes diferencialmente expressos entre células de lesões pré-invasivas com diferente potencial maligno, tais como DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC, representam as primeiras alterações moleculares que ocorrem nas células epiteliais na progressão do DC. Assim, o presente estudo teve o objetivo de validar os genes diferencialmente expressos identificados nesta

etapa da progressão e testar seu potencial como marcadores preditivos de risco de progressão do DCIS e/ou prognósticos em IDC. Nesse sentido, um grupo de 61 genes foi avaliado por RT-qPCR utilizando células epiteliais capturadas de um grupo semi-independente de amostras, pelo sistema *Taqman*, e 32 (52%) genes apresentaram expressão concordante com o experimento anterior de cDNA *microarray*. Para a análise por imunohistoquímica (IHQ), inicialmente foram selecionados quatro candidatos com maior expressão confirmada no DCIS puro (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19* e *CLTCL1*) e dois genes com maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC (*LOX* e *SULF1*). Três proteínas (*ANAPC13*, *CLTCL1* e *SULF1*) apresentaram expressão citoplasmática concordante com os dados de RNAm. Na sequência, estes marcadores foram avaliados ao longo da progressão do DC, tanto por RNAm quanto por proteína. A expressão do gene e da proteína de *ANAPC13* diminuiu ao longo da progressão do DC. A expressão do gene e da proteína de *CLTCL1* está reduzida somente nos estágios mais iniciais da progressão, e finalmente para *SULF1*, foi observado um aumento de expressão nos estágios iniciais da progressão seguido de uma redução significativa, somente em nível de proteína. Foi então avaliado o potencial prognóstico destes marcadores em lesões IDC. A presença da proteína *SULF1* foi associada com ausência de linfonodos comprometidos, expressão positiva do receptor de progesterona (PR) e grau de SBR 1, características de melhor prognóstico. As pacientes com a marcação citoplasmática positiva de *ANAPC13* apresentaram maior probabilidade de sobrevida global e livre de doença. Ainda, a análise multivariada identificou *ANAPC13* como um fator prognóstico independente. *ANAPC13* pertence ao complexo promotor/ciclossomo de anáfase (APC/C), e foi investigado mais profundamente neste trabalho. Foi observada uma associação entre menor expressão de *ANAPC13* e maior instabilidade genômica. Para uma avaliação preliminar do papel funcional de *ANAPC13*, foram construídas sequências senso e anti-senso do gene *ANAPC13*, as quais foram transfectadas na linhagem MCF-7, gerando linhagens com superexpressão de *ANAPC13* (OE-*ANAPC13*) e com silenciamento de

ANAPC13 (Sil-*ANAPC13*). Observamos maior índice proliferativo na OE-*ANAPC13* e menor proliferação na Sil-*ANAPC13*, quando comparadas aos controles sem transfecção (MCF-7) e transfectados com o vetor vazio (Mock). Por último, investigamos os genes modulados pela expressão de *ANAPC13* por cDNA *microarray*. Entre os genes modulados pelo nível de expressão de *ANAPC13* foi observada uma super-representação de processos biológicos relacionados ao ciclo celular, corroborando com os dados obtidos nos ensaios de proliferação. De forma geral, nossos resultados mostram que a investigação das diferenças moleculares entre células epiteliais tumorais do DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-IDC pode auxiliar na identificação de fatores moleculares envolvidos com as etapas iniciais da progressão do DC, com alto potencial para marcadores moleculares. Além disso, *ANAPC13* demonstrou ter um importante papel na progressão de DC.

SUMMARY

Abuázar CS. **[Identification and validation of molecular markers for the risk of progression of ductal carcinoma of the breast]**. São Paulo, 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Breast cancer is the most common cancer in women and it is responsible for high rates of mortality worldwide. Ductal carcinoma (DC) is the most frequent histological type and can be manifested as *in situ* (DCIS) and/or invasive carcinoma (IDC). Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) is a heterogeneous group of tumors with variable ability to progression. For this reason, it is very important to search for new molecular markers, able to predict the risk of progression and contribute to a better prognostic evaluation of the patients. In a previous study of our research group, using cDNA microarray and laser capture microdissection (LCM), the concept of molecular divergence was applied to independent groups of tumor epithelial cells captured from samples that mimic the progression of DC [pure DCIS, *in situ* component of a lesion with coexisting invasive carcinoma (DCIS-IDC) and invasive ductal carcinoma (IDC)]. Among these different types of cells, a more distinct molecular profile was observed between pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC, lesions with similar morphology. On the other hand, high molecular similarity was seen between epithelial cells from the *in situ* component of DCIS-IDC and epithelial cells from IDC, suggesting that the molecular changes appear before the cell manifest an invasive phenotype (CASTRO et al. 2008). Thus, differentially expressed genes between cells from pre-invasive lesions with different malignant potentials, such as pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC, represent the first molecular alterations that occur in epithelial cells during the progression of DC. Therefore, this study aimed to validate differentially expressed genes, identified at this point of progression, and test their potential as predictive markers for the risk of DCIS progression or as prognostic markers for IDC.

For that, a group of 61 genes was evaluated by RT-qPCR, using Taqman system, in epithelial cells captured from a semi-independent group of samples, and 32 (52%) genes presented concordant expression with the previous cDNA microarray study. For the immunohistochemistry (IHC) analysis, initially, four genes (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19* and *CLTCL1*) with higher expression in pure DCIS and two genes (*LOX* and *SULF1*) with higher expression in the *in situ* component of DCIS-IDC were chosen. Three proteins (*ANAPC13*, *CLTCL1* and *SULF1*) presented cytoplasmic expression data in agreement with the mRNA analysis. These markers were then evaluated along DC progression to check mRNA and protein levels. Gene and protein expression of *ANAPC13* decrease along DC progression. Gene and protein expression of *CLTCL1* were reduced only in the initial steps of progression. Finally, for *SULF1*, an increase of expression in the initial stages of progression was seen, followed by a significant reduction only at protein level. Next, we evaluated the prognostic potential of these markers in IDC lesions. The presence of *SULF1* was associated to the absence of compromised lymph nodes, positive expression of progesterone receptor (PR) and SBR grade I, features of good prognosis. Overall and disease-free survival rates were higher among patients with positive cytoplasmic expression of *ANAPC13*. Multivariate analysis demonstrated *ANAPC13* is an independent prognostic factor. *ANAPC13* belongs to the Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) and it was deeply investigated in this study. We observed an association between lower expression of *ANAPC13* and higher genomic instability. For a preliminary analysis of the functional role of *ANAPC13*, we constructed sense and anti-sense sequences of this gene, which were transfected into MCF-7 cell line, obtaining cell lines with overexpression of *ANAPC13* (OE-*ANAPC13*) and cell lines with silenced *ANAPC13* (Sil-*ANAPC13*). We observed higher proliferative rates in OE-*ANAPC13* and lower rates in Sil-*ANAPC13*, in comparison to the non-transfected (MCF-7) and to the transfected with empty pcDNA3.1/*myc*-His A (Mock) controls. Finally, we investigated genes modulated by the expression of *ANAPC13* in a cDNA microarray experiment. Among the genes modulated

by the level of *ANAPC13* expression, there was an over-representation of biological processes related to cell cycle, what corroborates with the results of the proliferation assay. In general, our results show that the investigation of molecular differences between tumor epithelial cells from pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC may help with the identification of molecular factors, involved in the initial steps of DC progression, with high potential to be molecular markers. Moreover, *ANAPC13* seems to perform an important role in DC progression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas brutas de Incidência de câncer de mama no Brasil. Estimativa a cada 100 mil mulheres.....	1
Figura 2	Estrutura morfológica da mama feminina normal, representando um ducto normal.....	6
Figura 3	Estrutura morfológica do carcinoma ductal <i>in situ</i> (DCIS) e do carcinoma ductal invasivo (IDC).....	13
Figura 4	Modelo clássico de progressão do carcinoma ductal de mama sugerido por WELLINGS e JESSEN (1973).....	14
Figura 5	Genes putativamente envolvidos com a progressão do carcinoma ductal de mama.....	25
Figura 6	Células tumorais epiteliais capturadas de lesões DCIS puras, componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC e IDC.....	29
Figura 7	Corrida de RNA total e amplificado no equipamento <i>Bioanalyser</i>	31
Figura 8	Plasmídeo pcDNA™3.1/myc-His A.....	56
Figura 9	Construções para ensaios funcionais.....	58
Figura 10	Representação das lesões ductais pré-invasivas DCIS puro e o componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC.....	68

Figura 11	Gráfico dos genes avaliados por RT-qPCR através do sistema <i>Taqman</i> , com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA <i>microarray</i>	71
Figura 12	Gráfico dos genes avaliados por RT-qPCR através do sistema <i>SYBR green</i> , com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA <i>microarray</i>	74
Figura 13	Expressão proteica de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 em DCIS puro e no componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC.....	82
Figura 14	Expressão de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama.....	89
Figura 15	Curvas de Kaplan-Meier para cálculo de sobrevida.....	94
Figura 16	Curvas de Kaplan-Meier, baseadas na marcação citoplasmática de ANAPC13, para análise de sobrevida global e livre de doença nos subgrupos moleculares de tumores invasivos de mama.....	99
Figura 17	Representação esquemática das sete alterações encontradas na sequência genômica de <i>ANAPC13</i>	103
Figura 18	Perfil de um segmento genômico em 3q22.2.....	104
Figura 19	Ilhas CpGs na região promotora e interna do gene <i>ANAPC13</i>	106
Figura 20	Expressão de <i>ANAPC13</i> por RT-qPCR em linhagens tratadas e não tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina.....	106

Figura 21	Expressão de ANAPC13 e instabilidade genômica em IDC....	109
Figura 22	Variantes de <i>splicing</i> de <i>ANAPC13</i>	112
Figura 23	Análise da expressão de variantes de <i>splicing</i> de <i>ANAPC13</i> através de RT-PCR.....	113
Figura 24	Reações de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para amplificação das variantes de <i>splicing</i> 1 e 2 do gene <i>ANAPC13</i>	114
Figura 25	Representação de variantes de <i>splicing</i> alternativo do gene <i>ANAPC13</i> em amostras IDC.....	114
Figura 26	Variantes de <i>Splicing</i> de <i>ANAPC13</i> nos grupos de amostras com baixa e alta expressão deste gene	115
Figura 27	Expressão de <i>ANAPC13</i> em linhagens de mama pelas técnicas de RT-qPCR e Western Blot.....	117
Figura 28	Análise da transfecção de MCF-7 com sequências senso e anti-senso de <i>ANAPC13</i>	119
Figura 29	Ensaio de proliferação celular em tempo real.....	120
Figura 30	Perfis de expressão, com enriquecimento significativo de processos biológicos, identificados pelo programa STEM.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Graus de estadiamento em câncer de mama, de acordo com a classificação de TNM.....	8
Quadro 2	Características clínico-patológicas dos casos selecionados para a validação por RT-qPCR.....	34
Quadro 3	Sequência, tamanho esperado do produto amplificado, eficiência, temperatura de pareamento e concentração dos oito oligonucleotídeos iniciadores desenhados para as reações de RT-qPCR com o sistema <i>SYBR green</i>	40
Quadro 4	Oligonucleotídeos desenhados para rastreamento de mutação em <i>ANAPC13</i>	50
Quadro 5	Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para investigação do perfil de expressão de variantes de <i>splicing</i> de <i>ANAPC13</i>	54
Quadro 6	Oligonucleotídeos iniciadores para a construção das sequências senso e anti-senso do gene <i>ANAPC13</i>	57
Quadro 7	Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referência.....	63
Quadro 8	Descrição dos genes com dados de expressão concordantes entre RT-qPCR e cDNA <i>microarray</i> , escolhidos para a avaliação por IHQ.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clinico-patológicas dos casos dos TMA1 e TMA2.....	45
Tabela 2	Resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC avaliados por RT-qPCR, utilizando o sistema Taqman.....	70
Tabela 3	Resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e o componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC avaliados por RT-qPCR, utilizando o sistema SYBR Green.....	73
Tabela 4	Expressão de ADFP, ANAPC13, ARHGAP19, CLTCL1, LOX e SULF1 em um TMA composto por lesões DCIS puro e componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC.....	78
Tabela 5	Associação entre expressão de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 e características clinicopatológicas em um TMA composto por lesões <i>in situ</i>	80
Tabela 6	Esquema para análise de IHQ, obtido pela combinação de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas.....	83
Tabela 7	Análise de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 em casos DCIS com diferentes evoluções.....	85
Tabela 8	Associação entre expressão citoplasmática de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 e características clinicopatológicas no TMA composto por amostras IDC.....	91

Tabela 9	Sobrevida em 5, 10 e 15 anos para marcação negativa e positiva de ANAPC13.....	95
Tabela 10	Fatores prognósticos independentes segundo o modelo de regressão de COX.....	96
Tabela 11	Associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13 e variáveis clinicopatológicas em amostras IDC Luminal A e B...	97
Tabela 12	Associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13 e variáveis clinicopatológicas em amostras IDC do subtipo HER2 ⁺ , basal e não classificável.....	98
Tabela 13	Lista de mutações encontradas no gene <i>ANAPC13</i>	102
Tabela 14	Número de perdas e ganhos nas amostras com maior e menor expressão de <i>ANAPC13</i>	110
Tabela 15	Número de alterações totais encontrados em cada cromossomo.....	110
Tabela 16	Análise da expressão de <i>ANAPC13</i> nos subtipos moleculares de câncer de mama.....	111
Tabela 17	Correlação de <i>Pearson</i> entre lâminas controles e <i>dye-swap</i> para cada amostra.....	121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACGH	Do inglês <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
ADH	Do inglês, <i>atypical ductal hyperplasia</i>
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC/C	Do inglês, <i>Anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
BM	Membrana basal
cDNA	DNA complementar a fita de RNA
Chr	Cromossomo
CK	Citoceratina
CNAs	Do inglês, <i>Copy Number Alterations</i>
CpG	Dinucleotídeo ou sítio citosina-fosfato-guanina
Cq	Do inglês, <i>Cycle quantification</i>
Cy3/Cy5	Citosina marcada com fluoróforos
DAB	Diaminobenzidina
DC	Do inglês, <i>Ductal Carcinoma</i>
DCIS	Do inglês, <i>Ductal Carcinoma in situ</i>
DCIS-IDC	Do inglês, <i>ductal carcinoma with coexisting invasive ductal carcinoma</i>
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNMT	Do inglês, <i>DNA Metil Transferase</i>
dNTPs	Nucleotídeos de DNA
dscDNA	DNA complementar dupla fita
EDTA	Do inglês, <i>Ethylene Diaminetetraacetic Acid</i>
Ef	Eficiência
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal Growth Fator Receptor</i>
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Do inglês, <i>Estrogen Receptor</i>
EU	Do inglês, <i>European Union</i>

FEA	Do inglês, <i>Flat Epithelial Atypia</i>
FFPE	Do inglês, <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HER2	Do inglês, <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2</i>
IDC	Do inglês, <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC	Do inglês, <i>Lobular Carcinoma</i>
LCM	Do inglês, <i>Laser Capture Microdissection</i>
LOWESS	Do inglês, <i>Local Weight Regression</i>
mL	Mililitro
mm	milímetro
mM	Milimolar
NA	Não aplicável ou não avaliável
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ND	Não determinado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAFF	Punção aspirativa por agulha fina
pb	par de base
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Do inglês, Progesterone Receptor
pTNM	Do inglês, <i>Pathologic Tumor Size, Nodal Status, and Metastasis</i>
PVDF	Do inglês, <i>Polyvinylidene fluoride</i>
RCPATH	Do inglês, <i>Royal College of Pathologists</i>
RIN	Do Inglês, <i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAa	RNA amplificado
RNAm	RNA mensageiro

RNTP	Nucleotídeos de RNA
rpm	rotações por minuto
RT-qPCR	Do inglês, <i>Reverse Transcription–Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAP	Do inglês, <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SBR	Do inglês, Scarff-Bloom-Richardson
SDS	Do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-Page	Do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SMC	Sítio múltiplo de clonagem
TA	Temperatura ambiente
TBS	Do inglês, <i>Tris-buffered saline</i>
TLDA	Do inglês, <i>Taqman Low Density Array</i>
TMA s	Do inglês, <i>Tissue Microarray</i>
TNM	Sistema de classificação de tumores malignos
μM	Micromolar
U	Unidade
μg	Microgramas
μg/μL	Microgramas por microlitro
μg/mL	Microgramas por mililitro
UICC	União Internacional Contra o Câncer

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Mama	1
1.2	Classificação dos Tumores Mamários	5
1.3	Carcinoma Ductal de Mama	9
1.4	Progressão do Carcinoma Ductal de Mama	13
1.5	Marcadores Moleculares Utilizados na Rotina Clínica de Carcinoma Ductal de Mama	17
1.6	Classificação de Tumores Mamários Baseada em Marcadores Moleculares	20
1.7	Busca de Novos Marcadores Moleculares para Progressão do Carcinoma Ductal de Mama	23
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Amostras	28
3.2	Microdissecção a Laser.....	29
3.2.1	Extração e Amplificação do RNA das Células Microdissecadas a Laser	30
3.3	Microdissecção Manual e Extração de DNA e RNA de Amostras IDC..	31
3.4	Tratamento de RNA Total com DNase.....	32
3.5	Síntese de cDNA.....	32
3.6	Validação dos Dados de cDNA Microarray por RT-qPCR.....	33
3.6.1	Validação dos Dados de cDNA Microarray utilizando o sistema <i>Taqman</i>	37
3.6.2	Validação dos dados de cDNA Microarray utilizando o Sistema <i>SYBR green</i>	37

3.6.3	Cálculo de Expressão Relativa para os Ensaios de RT-qPCR.....	42
3.7	Análise da Expressão Proteica de Candidatos Previamente Validados por RT-qPCR.....	42
3.7.1	Construção dos <i>Tissue Microarrays</i> (TMAs).....	42
3.7.2	Caracterização dos TMAs por Imunoistoquímica (IHQ) e Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization (FISH).....	43
3.7.3	Reações de Imunoistoquímica (IHQ).....	47
3.8	Avaliação de Candidatos a Marcadores Moleculares para Predição De Invasão em DCIS.....	49
3.9	Rastreamento de Mutação no Gene <i>ANAPC13</i>	50
3.10	Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH).....	51
3.11	Cultivo Celular.....	51
3.12	Extração de DNA e RNA das Linhagens Celulares.....	52
3.13	Investigação do Efeito da Regulação Epigenética por Metilação do DNA na Expressão de <i>ANAPC13</i>	52
3.14	Investigação da Presença de Variantes de <i>Splicing</i> do Gene <i>ANAPC13</i>	53
3.15	Construção do Vetor Recombinante para Ensaios Funcionais do Gene <i>ANAPC13</i>	55
3.15.1	Clonagem.....	55
3.15.2	Transformação.....	57
3.15.3	PCR de Colônia e Extração Plasmidial.....	57
3.16	Western Blot.....	58
3.17	Transfecção com Lipossomos.....	60
3.18	Ensaio de Proliferação Celular <i>In Vitro</i> em Tempo Real.....	61
3.19	Análise das Linhagens Celulares pela Técnica de cDNA <i>Microarray</i>	62
3.20	Análise dos Resultados.....	64
3.20.1	Análise dos Resultados das Reações de RT-qPCR.....	64
3.20.2	Análise dos Resultados de Imunoistoquímica.....	65
3.20.3	Análise dos Resultados de aCGH.....	65
3.20.4	Análise dos Resultados de cDNA <i>Microarray</i>	66

4	RESULTADOS	67
4.1	Seleção de Candidatos a Marcadores Moleculares para Progressão de Carcinoma Ductal de Mama	67
4.1.1	Avaliação da Expressão Gênica em Células Epiteliais Tumerais de DCIS Puro e do Componente <i>In Situ</i> do DCIS-IDC	67
4.1.2	Seleção de Candidatos para Avaliação por Imunoistoquímica (IHQ)	75
4.1.3	Avaliação da Expressão Proteica em Lesões DCIS Puras e no Componente <i>In Situ</i> do DCIS-IDC	77
4.1.4	Avaliação de <i>ANAPC13</i> , <i>CLTCL1</i> E <i>SULF1</i> como Marcadores Candidatos a Predição de Invasão em DCIS	82
4.1.5	Expressão Proteica ao Longo da Progressão de Carcinoma Ductal de Mama.....	87
4.1.6	Avaliação do Potencial Prognóstico de <i>ANAPC13</i> , <i>CLTCL1</i> E <i>SULF1</i> .	90
4.2	Gene <i>ANAPC13</i>	100
4.2.1	Análise de Rastreamento de Mutação e de Deleção Cromossômica do Gene <i>ANAPC13</i>	100
4.2.2	Investigação de Mecanismos envolvidos com a Redução de Expressão de <i>ANAPC13</i> ao longo da Progressão do DC	104
4.2.3	Relação entre a Expressão de <i>ANAPC13</i> e o Número de <i>Copy Number Alterations</i> (CNAs)	107
4.2.4	Investigação da Presença de Variantes de <i>splicing</i> Alternativo do Gene <i>ANAPC13</i>	112
4.2.5	Ensaio funcional com o Gene <i>ANAPC13</i>	116
4.2.6	Análise das Linhagens Celulares por cDNA <i>Microarray</i>	121
5	DISCUSSÃO	124
6	CONCLUSÃO	140
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

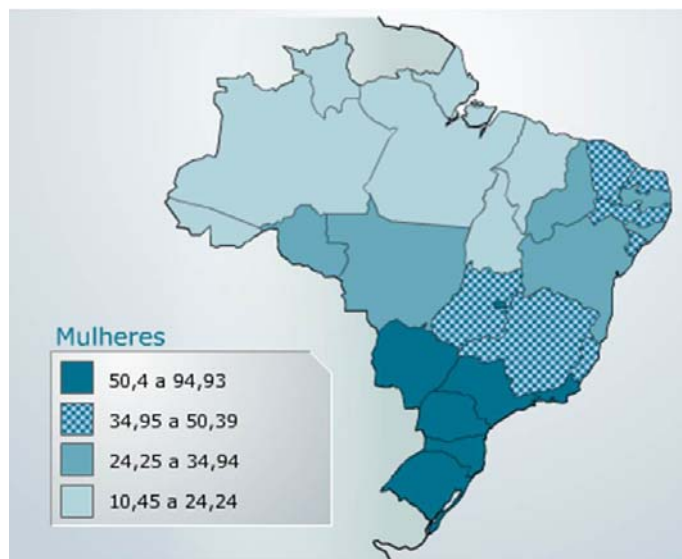
ANEXOS

- Anexo 1** Protocolo de Amplificação de RNA Mensageiro
- Anexo 2** Resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e componente *in situ* do DCIS-IDC avaliados por RT-qPCR, utilizando o sistema *Taqman*
- Anexo 3** Gráficos de expressão na análise de RT-qPCR pelo sistema *Taqman* considerando amostras com mesmo grau nuclear.
- Anexo 4** Gráficos de expressão ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama dos genes validados por RT-qPCR
- Anexo 5** Associação entre expressão de *ANAPC13* e sobrevida global e livre de doença em pacientes com grau de SBR 1, 2 ou 3 e com ≤ 3 ou >3 linfonodos comprometidos
- Anexo 6** Genes co-regulados ao *ANAPC13*, pertencentes a perfis de expressão (A e B) que apresentam enriquecimento de processos biológicos relacionados ao ciclo celular.
- Anexo 7** Artigo: *Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: early events in the progression of preinvasive ductal carcinoma of the breast.*

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o dos tipos de câncer com maior incidência mundial. No Brasil, é o que mais causa morte entre as mulheres. Em 2010, cerca de 13.000 morreram pela doença no país. Estima-se para o ano de 2012, a ocorrência de 52.680 novos casos na população feminina brasileira, representando aproximadamente 20,2% dos 260.640 casos de câncer entre mulheres, com um risco estimado de 52,50 casos para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011). A distribuição da incidência da doença no Brasil pode ser visualizada na Figura 1.



Fonte: Ministério da Saúde (2011).

Figura 1 - Taxas brutas de Incidência de câncer de mama no Brasil. Estimativa a cada 100 mil mulheres.

Como observado na Figura 1, as maiores taxas de incidência de câncer de mama encontram-se nas regiões sul e sudeste do país. O estado de São Paulo apresenta segunda maior incidência (71,77 casos a cada 100 mil mulheres) perdendo apenas para o estado do Rio de Janeiro (94,93:100 mil) (Ministério da Saúde 2011).

O câncer de mama pode ser esporádico, representando cerca de 90% dos casos (TIEZZI 2009) ou hereditário, representado por cerca de 10% dos casos. O risco de desenvolvimento da doença aumenta segundo a idade, a qual é considerada o fator de risco mais importante. Segundo MCPHERSON et al. (2000), a incidência dobra a cada 10 anos, no período pré-menopausa. No período pós-menopausa, mulheres entre 80 e 85 anos apresentam uma chance 15 vezes maior de aparecimento da doença em comparação a mulheres com 30-35 anos (VOGEL 2008). O histórico hormonal, com menarca precoce (antes dos 12 anos) e menopausa tardia (após 55 anos) e o histórico reprodutivo da mulher (nuliparidade ou idade tardia da primeira gestação), também representam fatores importantes no aparecimento de câncer de mama. Esses efeitos podem ser consequência do maior tempo de exposição aos hormônios femininos endógenos, estrógeno e progesterona, os quais são ativadores de proliferação das células do tecido mamário (PARKIN et al. 2001; OLIVEIRA et al. 2009). Mulheres com lesões benignas prévias tais como hiperplasia florida ou moderada e hiperplasia epitelial atípica (ADH), apresentam risco de 1,5 a 2 vezes e de 4 a 5 vezes mais alto de desenvolvimento de carcinoma mamário invasivo, respectivamente. A densidade mamária e o índice de massa corpórea podem também

representar fatores de risco (MCPHERSON et al. 2000). O estilo de vida, com hábitos como dieta gordurosa, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e fatores ambientais como exposição esporádica ou sequencial a carcinógenos químicos, radiação ionizante e não ionizante e os estados inflamatórios crônicos (bacterianos, virais ou parasitários) também são fatores importantes para o desenvolvimento de câncer de mama (MCPHERSON et al. 2000). Ainda, é bastante debatida a influência do uso de contraceptivos orais por longo período de tempo no risco de surgimento da doença (FRYE et al. 2006; TEWARI et al. 2007; MARCHBANKS et al. 2012).

O risco de desenvolvimento câncer de mama é também associado a questões socioeconômicas. Países em desenvolvimento apresentam um crescimento mais alto da incidência da doença, o que pode ser devido ao aumento da expectativa de vida e à crescente urbanização (LEE et al. 2012).

Cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama apresentam um fator genético preponderante. Pacientes com um histórico familiar da doença em um parente de primeiro grau (mãe, irmã, filha) apresentam um efeito aditivo no desenvolvimento de lesões proliferativas ou de atipia, o que pode influenciar o risco para o aparecimento de câncer de mama (VOGEL 2008). Mutações em dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*, envolvidos com o mecanismo de reparo do DNA, foram identificadas com uma alta frequência em famílias com alto risco para a doença (HILL et al. 1997), aumentando em até 80% a chance de desenvolver câncer de mama antes dos 75 anos de idade. Síndromes familiares, como Li-Fraumeni (devido a mutações em *TP53*) e

síndrome de Cowden's (devido a mutações no gene *PTEN*) aumentam o risco de aparecimento de tumores mamários. Há ainda relatos de mutação germinativa em outros genes como *STK11*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* e *PALB2* (GAGE et al. 2012) no câncer de mama hereditário.

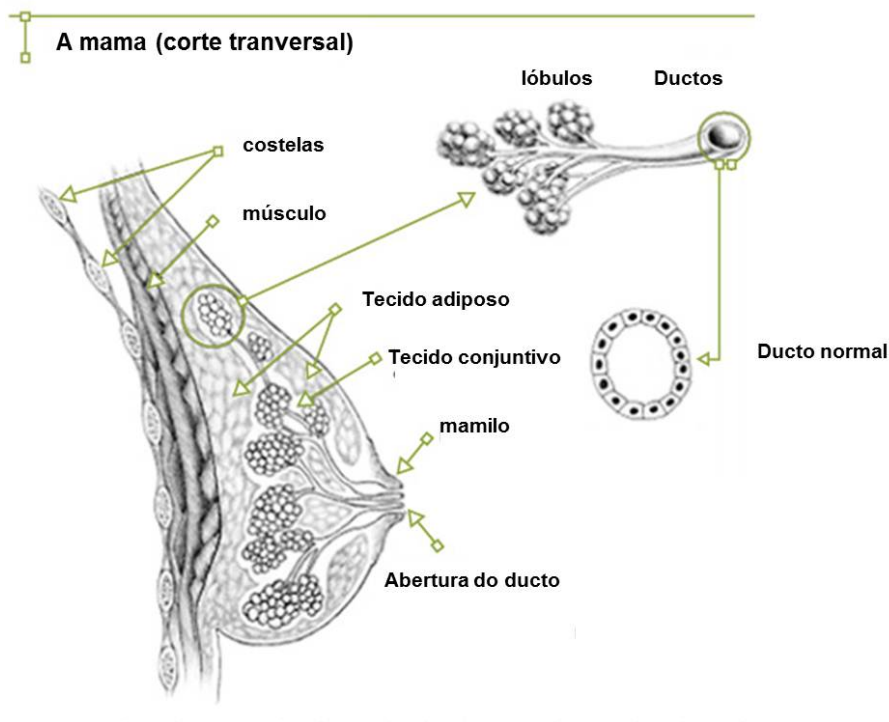
Entre os exames de imagem, a mamografia é o mais frequentemente utilizado para detecção de câncer de mama. Para o diagnóstico, há também exames auxiliares como punção aspirativa por agulha fina (PAFF) ou por agulha grossa (*core biopsy*) (TSE e TAN 2010), que podem ou não serem guiadas por mamografia ou ultrassom em função do tamanho e localização da lesão.

Além das características histo-patológicas da lesão, a expressão de receptores hormonais de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e do oncogene *ERBB2* (item 1.5) representam importantes fatores prognósticos e preditivos de resposta à terapia em câncer de mama. O tratamento pode ser local, com cirurgia e/ou radioterapia, e/ou sistêmico com quimioterapia, hormonioterapia (que consiste no tratamento com modulador seletivo do receptor de estrógeno no caso de pacientes com positividade de expressão para este receptor) e/ou terapia imunológica. As cirurgias podem ser conservadoras (quadrantectomia, tumorectomia ou ressecção segmentar), onde são retiradas apenas as áreas afetadas pela neoplasia, ou não conservadoras (mastectomia preservadora de pele, adenectomia mamária terapêutica, mastectomia simples ou total e mastectomia radical). O procedimento cirúrgico pode também incluir biópsia de linfonodo sentinela, com ou sem esvaziamento de linfonodos axilares. O tratamento cirúrgico

pode ser seguido de terapia adjuvante (pós-cirúrgica), com radioterapia e/ou quimioterapia e/ou hormonioterapia. A terapia adjuvante auxilia na prevenção de recorrência da doença ou do aparecimento de metástases à distância.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS

A mama feminina normal adulta apresenta uma estrutura arborescente e ramificada, sendo composta por elementos epiteliais e estromais. O componente epitelial da mama é organizado em lóbulos que são compostos por grupos de ácinos. Estes se conectam em ductos terminais (unidade ducto-lobular terminal) que se unem formando ductos maiores. Há cerca de 15 a 20 ductos maiores cuja abertura é na papila. Já o estroma é composto de quantidade variável de tecido adiposo e tecido conectivo fibroso, que compreende a maior parte do volume da mama no estado não lactente. Quanto ao aspecto histológico, o epitélio ductal normal da mama consiste de camada interna (luminal) de células epiteliais cubóides e camada externa de células mioepiteliais, apoiada na membrana basal do ducto (SCHNITT 1995a) (Figura 2).



Fonte: Portal de Oncologia Português (2012).

Figura 2 - Estrutura morfológica da mama feminina normal, representando um ducto normal.

Os dois tipos de câncer de mama mais comuns são o carcinoma ductal (DC) e o lobular (LC), sendo que o DC corresponde a 80% de todos os tumores de mama (BOMBONATI e SGROI 2011). Dentre os subtipos histológicos do DC e LC, há o carcinoma *in situ*, em que as células epiteliais se dividem anormalmente, porém, permanecem dentro de ductos ou lóbulos, restrito à membrana basal e o invasivo, em que as células invadem além dos ductos ou lóbulos, com ruptura da membrana basal, apresentando invasão de células tumorais em tecidos adjacentes, no sangue e circulação linfática (SCHNITT 1995b).

Além do DC e LC, a Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda reconhece outros tipos histológicos de câncer de mama: carcinoma tubular,

carcinoma mucinoso, carcinoma papilífero, carcinoma adenocístico, carcinoma medular, carcinoma apócrino, carcinoma secretor e carcinoma metaplásico.

O estadiamento dos tumores mamários segue o sistema de classificação de tumores malignos (sistema TNM), criado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). O estadiamento clínico é baseado no sistema TNM de acordo com exames físicos e diagnóstico por imagem. O fator T refere-se à presença e extensão do tumor primário e é classificado em T1, T2, T3 e T4, com tamanho menor ou igual a 2 cm, entre 2 e 5 cm, maior que 5 cm ou tumor de qualquer tamanho que apresente extensão direta à parede torácica ou à pele, respectivamente. O fator N refere-se à metástase em linfonodos regionais, sendo o tumor classificado como N0 na ausência de metástases linfonodais, como N1, na presença de células tumorais em linfonodos axilares homolaterais móveis, como N2, na presença de células tumorais em linfonodos axilares homolaterais fixos e como N3, na presença de células tumorais em linfonodos infraclaviculares mamários internos (detectado por exame clínico ou por estudos de imagem). O fator M refere-se à presença de metástases à distância e pode ser classificado segundo a ausência ou presença de metástases em M0 e em M1, respectivamente (SOBIN e WITTEKIND, 2004).

O estadiamento patológico segue os critérios pTNM (TMN patológico) e é semelhante à classificação clínica. A categoria p(T) corresponde a (T), onde o tamanho do tumor é a medida do componente invasivo. O fator p(N) corresponde ao N e requer a ressecção e exame de linfonodos axilares

inferiores, sendo pN0 a ausência de metástase em linfonodos regionais, pN1 quando há de 1 a 3 linfonodos comprometidos, pN2 com 4-9 linfonodos acometidos e pN3 com metástase em 10 ou mais linfonodos. O fator p(M) corresponde ao M.

Os estadios são numerados de 0 a IV, em ordem decrescente de sobrevida. O estadio 0 – carcinoma *in situ*, estadio I – carcinoma invasivo localizado, estadio II – carcinoma invasivo localmente limitado ou espalhado regionalmente, estadio III – carcinoma invasivo localmente extensivo ou espalhado regionalmente, e estadio IV – carcinoma invasivo extensivo com presença de metástase à distância. Os grupamentos por estadio são descritos na Quadro 1.

Quadro 1 - Graus de estadiamento em câncer de mama, de acordo com a classificação de TNM.

Estadios	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio 1	T1*	N0	M0
Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Abreviações: Tis, Tumor *in situ*. (*), T1 inclui o T1mic, o qual corresponde à microinvasão, com extensão de células neoplásicas além da membrana basal, alcançando os tecidos adjacentes, sem focos tumorais maiores do que 0,1 cm em sua maior dimensão.

Fonte: SOBIN e WITTEKIND (2004).

1.3 CARCINOMA DUCTAL DE MAMA

Neste estudo, nos ateremos ao DC, o qual pode se apresentar morfológicamente em dois subtipos, *in situ* (DCIS) e/ou invasivo (IDC) (Figura 3). O DCIS pode apresentar diferentes evoluções, podendo tanto progredir rapidamente para a forma invasiva quanto evoluir lentamente por um longo período da doença (PORTER et al. 2003). É geralmente categorizado pela descrição arquitetural em cinco grupos: comedo (células malignas de alto grau dentro do ducto com frequente necrose na área central), cribriforme (padrão de crescimento em fenestra com proliferação relativamente homogênea), papilar (ducto com tufos papilares fibrovasculares), sólido (ducto totalmente preenchido por células neoplásicas) e micropapilar (projeções papilíferas em forma de dedos em espaços ductais dilatados) (SCHNITT 1995b). A classificação patológica do DCIS é baseada no grau nuclear (baixo, intermediário e alto), diferenciação arquitetural (polarização das células no revestimento ductal) e necrose (presença ou ausência) (BURSTEIN et al. 2004). Pacientes com DCIS de grau baixo e intermediário podem ter doença multifocal, caracterizada por crescimento intraductal descontínuo com espaços de mais de um centímetro entre os focos tumorais. Por outro lado, pacientes com DCIS de alto grau tendem a apresentar lesões mais contínuas, com espaços menores que cinco mm entre os focos do tumor (FAVERLY et al. 1994).

Antes da introdução da mamografia, o diagnóstico de DCIS era incomum representando apenas de 2 a 3% de todos os cânceres de mama

(ERNSTER et al. 1997) e era detectado por sintomas clínicos, massa palpável e doença de Paget no mamilo. Porém, com a adoção desta tecnologia, juntamente com a ressonância magnética para o diagnóstico, as taxas de detecção apresentaram aumentos significativos. No exame de mamografia, DCIS é detectado através de padrões típicos de micro calcificações (LEONARD e SWAIN 2004). Desta forma, o índice de DCIS aumentou para cerca de 20 a 30% de todos os cânceres de mama. É esperado que as taxas mundiais de detecção de DCIS aumentem exponencialmente à medida que expectativa de vida das mulheres cresce e um número maior de países em desenvolvimento adota tecnologias de diagnóstico avançadas (KUERER et al. 2009). Para DCIS, o tamanho da lesão, o grau de atipia nuclear e a presença de comedo necrose são fatores importantes na determinação do prognóstico.

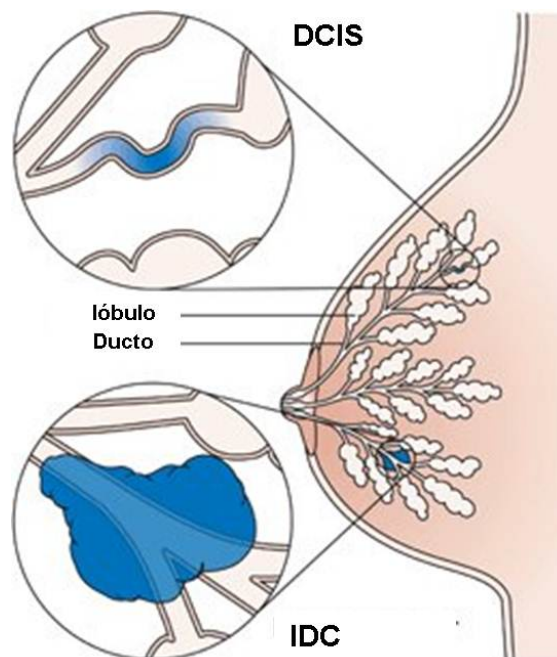
A mastectomia simples, sem quimioterapia, pode ser curativa em 98% dos casos de DCIS (DELANEY et al. 1997; BURSTEIN et al. 2004). Entretanto, a cirurgia conservadora, por ser menos agressiva, pode ser mais adequada, especialmente nos casos de DCIS não sintomáticos, detectados por rastreamento. No entanto, com a cirurgia conservadora, há um aumento da probabilidade de recidiva local ou de progressão para doença invasiva em relação ao tratamento com cirurgias não conservadoras. Segundo STUART et al. (2005), os fatores que aumentam o risco de recidiva ou de progressão após a cirurgia conservadora estão relacionados à idade jovem no diagnóstico, ao tamanho do tumor, a margens tumorais positivas, a lesões de alto grau e à omissão de radioterapia adjuvante. Desta forma,

após a cirurgia conservadora, é extremamente aconselhável a utilização de radioterapia adjuvante. Há indícios que a utilização da radioterapia adjuvante pode diminuir em até 50% as chances de recidiva local em DCIS (STUART et al. 2005). Protocolos que combinam cirurgia, seguida por radioterapia e hormonioterapia, podem apresentar redução de 40 a 60% no risco de recorrência ipsilateral (FISHER et al. 2001). É importante mencionar que nem todos os casos de DCIS progridem para a lesão invasiva, sendo um desafio identificar as lesões com capacidade de progressão para a escolha do tratamento mais adequado para cada paciente. Ainda, DCIS pode estar associado ao tumor microinvasivo oculto e nestes casos, as pacientes devem ser tratadas segundo as diretrizes estabelecidas para a doença invasiva. Além disso, a expressão dos marcadores ER e PR é importante no direcionamento da conduta clínica de casos DCIS (item 1.5) (STUART et al. 2005).

Para a classificação patológica do IDC, é normalmente utilizado o sistema de graduação de Scarff-Bloom Richardson modificado por Elston-Ellis (Nottingham) (SBR modificado), recomendado por vários órgãos internacionais, tais como a OMS, União Européia (EU), *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e *Royal College of Pathologists (UK RCPATH)*. Este sistema é baseado na avaliação de três características morfológicas: a capacidade de formação de estruturas tubulares ou glandulares, pleomorfismo nuclear e índice mitótico (RAKHA et al. 2010).

Em IDC, o *status* dos linfonodos (comprometidos ou não comprometidos pela neoplasia), o tamanho do tumor e o grau histológico

(caracterizado pela diferenciação tumoral) são três características importantes utilizadas na rotina clínica para avaliação prognóstica de lesões em estágio precoce (RAKHA et al. 2010). A biópsia do linfonodo sentinela, que é o primeiro linfonodo a drenar as micrometástases da área onde se encontra o tumor primário, é uma técnica amplamente aceita na rotina clínica já que é capaz de identificar progressão anatômica das células tumorais, a partir do sítio primário, para os linfonodos regionais através de capilares linfáticos (NATHANSON 2003). Além disso, o *status* dos linfonodos guia a seleção de pacientes elegíveis à terapia adjuvante. Assim, as pacientes linfonodo positivas são elegíveis à terapia adjuvante. Entretanto, também podem ser elegíveis as pacientes linfonodo negativas, porém com pelo menos um fator de risco, como grande tamanho tumoral, *status* ER negativo e lesão de alto grau. A quimioterapia neoadjuvante também pode ser utilizada, com o objetivo de diminuir o tamanho do tumor antes da sua remoção e aumentar a probabilidade de conservação das mamas em cânceres mais avançados. Ainda, para IDC, o *status* do marcador *Human epidermal growth factor receptor type 2* (HER2) é muito importante na determinação da conduta terapêutica (item 1.5).



Fonte: Cancer Research UK (2012).

Figura 3 - Estrutura morfológica do carcinoma ductal *in situ* (DCIS) e do carcinoma ductal invasivo (IDC).

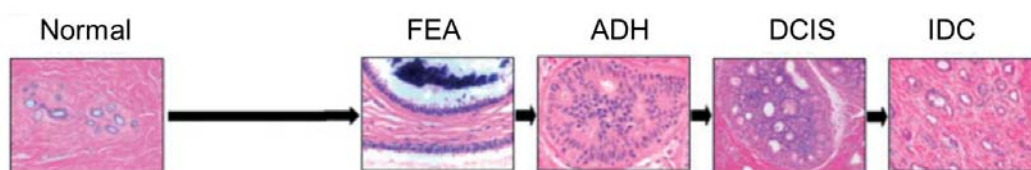
1.4 PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL DE MAMA

Durante as três últimas décadas foi possível o delineamento da biologia e patologia do câncer. A hipótese de que o processo carcinogênico é composto por múltiplas etapas, nas quais um conjunto de eventos contribui para a transformação celular e subseqüente estágios malignos, é hoje amplamente aceita (CONFORTI-FROES e ROSSIT 2000).

Durante a progressão tumoral, as células do tumor primário podem perder a capacidade de adesão e iniciar o processo de invasão da membrana basal do tecido de origem, com extravasamento para a circulação sanguínea ou linfática e formando áreas de proliferação em outros tecidos,

em um processo conhecido como metástase (FIDLER 2003). Em mama, uma vez que as células tumorais adquirem a capacidade de degradar a membrana basal, o tumor invasivo ganha o potencial de disseminação para órgãos distantes, sendo o fígado, pulmão e tecido ósseo, os sítios mais frequentes.

O modelo clássico de progressão do DC sugere uma progressão contínua, mas não obrigatória através de uma série de etapas. O processo se inicia em um tecido normal, progredindo para uma atipia epitelial plana (FEA), seguido por uma hiperplasia ductal atípica (ADH), avançando para um DCIS e culminando em um IDC, o qual pode resultar na doença metastática (Figura 4) (WELLINGS e JENSEN 1973).



Abreviações: FEA, hiperplasia epitelial plana; ADH, hiperplasia ductal atípica; DCIS, carcinoma ductal *in situ*; IDC; carcinoma ductal invasivo.

Fonte: BOMBONATI e SGROI (2011).

Figura 4 - Modelo clássico de progressão do carcinoma ductal de mama sugerido por WELLINGS e JESSEN (1973).

Na literatura, há um maior consenso de que o carcinoma o DCIS seja um precursor do IDC, seguindo a progressão estabelecida para a maioria dos tumores (WELLINGS et al. 1975; ZHUANG et al. 1995; AMARI et al. 2003; ALLRED et al. 2008). Entretanto, a classificação histopatológica e os biomarcadores convencionais não são completamente efetivos para

classificação de lesões DCIS quanto a sua capacidade de invasão de tecidos adjacentes e conseqüentemente de progressão para a doença invasiva (WARNBERG et al. 2001).

O potencial de progressão para um carcinoma invasivo é variável entre os diferentes tipos histológicos de DCIS e o conhecimento da biologia e do comportamento clínico destas lesões permanecem incompletos, dificultando a compreensão da verdadeira relação entre DCIS e cânceres mamários invasivos (KUERER et al. 2009). Estima-se que 14 a 50% das lesões DCIS possam progredir para lesões invasivas quando não tratadas (ERBAS et al. 2006). Algumas pacientes com DCIS apresentam progressão para a doença invasiva enquanto outras não, sendo um grande desafio, a descoberta dos mecanismos que conferem esta variação individual entre as mulheres. Portanto, a identificação de fatores de risco variáveis associados à DCIS pode ter um papel importante na prevenção da progressão de carcinomas mamários (KUERER et al. 2009).

Muitos grupos têm apresentado evidências que anormalidades genéticas e moleculares, importantes para a aquisição da capacidade de invasão, já estão presentes nas células epiteliais dentro dos ductos (MA et al. 2003; SCHUETZ et al. 2006; CASTRO et al. 2008). A sobrevivência de células epiteliais DCIS em meio de hipóxia e sem nutrientes promove instabilidade genética e desencadeia o fenótipo invasivo através da seleção de células neoplásicas com capacidade de invadir tecidos adjacentes (BINDRA e GLAZER 2005; MATHEW et al. 2007; ESPINA e LIOTTA 2011). Ainda, é importante mencionar que a invasão de tecidos adjacentes não

ocorre apenas com a participação do componente epitelial, mas também é devida à contribuição do microambiente tumoral. Alguns estudos vêm investigando que a progressão para a invasão pode ser promovida por fibroblastos e inibida por células mioepiteliais. Neste processo, as células mioepiteliais suprimiriam o crescimento do tumor enquanto que os fibroblastos estimulariam o seu crescimento. Uma das principais funções das células mioepiteliais seria a de síntese e manutenção da membrana basal (BM). A degradação da membrana basal é vista como um marco para a malignidade e invasão (HU et al. 2008). Acredita-se que as células mioepiteliais percam progressivamente sua função como supressores de tumor e desapareçam durante a transição do DCIS para o IDC (BRASKY e KARLIN 2005; POLYAK e HU 2005).

Apesar de avanços no diagnóstico histológico e na determinação do prognóstico individual de cada paciente, as bases moleculares da progressão do câncer mamário ainda precisam ser mais claramente elucidadas (MA et al. 2003). Os tumores mamários são geneticamente heterogêneos, apresentando muitos subtipos moleculares distintos assim como riscos diferentes de progressão (HU et al. 2008). Portanto, um dos maiores desafios na pesquisa exploratória do câncer é a compreensão detalhada dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral, invasão local e formação de metástases, investigando perfis moleculares que possam tanto distinguir claramente os diversos tipos de tumores quanto ter a capacidade de prever possíveis recidivas assim como o potencial invasivo das diversas lesões.

1.5 MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS NA ROTINA CLÍNICA DE CARCINOMA DUCTAL DE MAMA

Marcadores moleculares têm sido extremamente investigados com o objetivo de fornecer informações mais precisas em relação ao prognóstico e a predição de resposta ao tratamento (MOLINA et al. 2005). A detecção da expressão ER e PR e a amplificação e ativação do oncogene *ERBB2* são os três marcadores mais utilizados na rotina clínica do carcinoma ductal de mama (HARRIS et al. 2007; WOLFF et al. 2007; HAMMOND et al. 2010).

Os hormônios estrógeno e progesterona agem juntos na diferenciação e crescimento do epitélio mamário via seus receptores nucleares, os quais modulam a transcrição de diversos genes alvo (JENSEN e JORDAN 2003). ER promove a ativação de vários genes, entre eles o gene codificador de PR. Assim a detecção dos dois receptores hormonais sinaliza que ER está funcional (EISENBERG e KOIFMAN 2001).

Os receptores hormonais são expressos em cerca de 50-60% dos pacientes com DC e são marcadores moleculares indicativos de bom prognóstico. Tumores que apresentam expressão de receptores hormonais apresentam menor índice proliferativo, são mais diferenciados e elegíveis a terapias endócrinas (LEONARD e SWAIN 2004). Os anti-estrogênios, como o tamoxifeno, são inibidores competitivos de estrógeno e inibem sua atividade mitogênica no câncer de mama. Seu mecanismo de ação inativa a conformação de um dos receptores de ER, o ER α , impedindo a ligação da proteína AF-2, essencial para ativação deste receptor. Assim, a transcrição

via ação de AF-2 é inibida (SHIAU et al. 1998; PLATET et al. 2004). Desta forma, o tamoxifeno funciona como um antagonista do estrógeno em mama. Tumores ER e PR positivos tem grande benefício da terapia hormonal, mas aqueles contendo apenas ER ou PR positivos também apresentam respostas significativas (BARDOU et al. 2003). O uso de tamoxifeno como terapia adjuvante reduz as taxas de recidiva em cinco anos (COME et al. 2003). Ainda em pacientes metastáticos com estatus ER positivo, o uso de tamoxifeno pode ser efetivo em aproximadamente 50% dos casos (OSBORNE 1998). O tratamento endócrino é indicado tanto para lesões DCIS quanto IDC, positivas para receptores hormonais (SCHWARTZ, 2001 e PLATET et al. 2004).

ERBB2 é um dos quatro membros da família de receptores de fator de crescimento epitelial: EGFR (HER1/ERBB1); ERBB2 (HER2 ou HER2/ neu); ERBB3 (HER3); e ERBB4 (HER4). As proteínas desta família são transmembrânicas com domínio citoplasmático tirosina quinase e estão envolvidas com o desencadeamento de sinais proliferativos e anti-apoptóticos e com a ativação de vias como MAPK, PI3K/Akt e mTOR. Desta forma, podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral, sendo HER2 o membro da família com maior importância para câncer de mama (HYNES e MCDONALD 2009). Na rotina clínica, o *status* da proteína (HER2) é determinado por imunohistoquímica (IHQ), com um escore de 0 a 3+, sendo 0 e 1+ considerados negativos, 2+ indeterminado e 3+ positivo.

Estudos sobre *ERBB2* e DCIS sugerem que, em 50% dos casos, a superexpressão deste gene está associada a lesões pouco diferenciadas, comedo e de alto grau (MILLIS et al. 1996; VOS et al. 1999). Cerca de 60% dos casos DCIS apresentam maior expressão da proteína HER2 (BACUS et al. 2000), a qual é mais frequentemente encontrada em DCIS do que em IDC, sugerindo um possível papel na tumorigênese (DIGIOVANNA et al. 2002). No entanto, a presença de HER2 não está associada à conduta clínica em DCIS.

Em IDC, cerca de 25 a 30% dos tumores mamários apresentam superexpressão da proteína HER2, especialmente devido à amplificação do gene *ERBB2*, o que confere um prognóstico mais agressivo (SLAMON et al. 1989; PICCART-GEBHART et al. 2006; TANEJA et al. 2010), com menores taxas de sobrevida (PEGRAM et al. 1998; CURTIS et al. 2012). Para IDC, os casos com marcação indeterminada (2+) na IHQ são avaliados pela técnica *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) para verificar a presença de amplificação genômica de *ERBB2*. A presença de HER2 é um marcador preditivo de resposta a trastuzumab (também conhecido como herceptina), um anticorpo monoclonal que reconhece o domínio extracelular do receptor, impede sua dimerização e inibe sua atividade de quinase (HYNES e LANE 2005) ou à Lapatinib, uma pequena molécula, inibidora de domínios tirosina quinase (SPECTOR et al. 2005).

Além dos três marcadores clássicos, acima descritos, há outros marcadores importantes para a rotina clínica como Ki67, um marcador de proliferação celular, utilizado como fator prognóstico. Há ainda, p53, p14^{ARF},

ciclina D1, ciclina E, TBX 2/3, BRCA1/2 (item 1.1) e VEGF, os quais estão envolvidos com processos como a regulação das vias dos genes supressores de tumor TP53 e RB, resposta à dano de DNA, resposta à angiogênese e metástase (TANEJA et al. 2010).

1.6 CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MAMÁRIOS BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES

Devido à heterogeneidade do câncer de mama, tumores com a mesma classificação clínica e histopatológica podem apresentar diferentes evoluções clínicas no que diz respeito à recidiva, progressão e desenvolvimento de metástases. Assim, a utilização de um perfil molecular pode auxiliar na classificação dos tumores mamários. Nesse sentido, PEROU et al. (2000); SORLIE et al. (2001), através da tecnologia de cDNA *microarray*, sugeriram uma classificação molecular para os tumores mamários invasivos. Essa classificação é baseada na expressão de ER, PR, HER2 e EGFR, assim como na expressão de marcadores de citoceratinas (CK) (5, 6, 8, 14 e 18). Os carcinomas mamários foram subdivididos em cinco grupos: luminal A, luminal B, HER2⁺, *normal breast-like* e basal ou basalóide. O subtipo luminal A apresenta expressão positiva do receptor ER e/ou PR e expressão negativa de HER2, alta expressão de CKs 8 e 18 e é geralmente associado a um bom prognóstico e à boa resposta a terapia antiestrogênica. O subtipo luminal B apresenta expressão positiva dos receptores ER e/ou PR, HER2 e CKs 8 e 18, e é geralmente associado a um

prognóstico menos favorável. O subtipo HER2⁺ (expressão negativa dos receptores ER, PR e positiva de HER2) apresenta o comportamento mais agressivo de todos, porém com boa resposta a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab. Os subtipos *normal-like* e o subtipo basal ou “basalóide” são denominados triplo negativos (expressão negativa dos receptores PR, ER e HER2). O *normal-like* apresenta alta expressão de genes característicos de células epiteliais basais e de células adiposas e baixa expressão de genes característicos de células epiteliais luminais. É um subtipo de crescimento lento, pouco agressivo e de bom prognóstico apesar de não responder à terapia hormonal ou terapia para HER2. O subtipo basal apresenta expressão das CK5/6 e CK14, 17 e/ou EGFR, pode estar ligado a mutações genéticas no BRCA1/2, e não possui alvo terapêutico definido, como os outros subtipos, e por isso tem associação com pior prognóstico. Portanto, não responde nem ao tratamento com drogas antiestrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 (CIANFROCCA e GRADISHAR 2009).

Na busca de perfis para classificação molecular dos tumores, foram sugeridos dois testes utilizando marcadores com potencial prognóstico e preditivo. O primeiro deles, chamado de *Mamaprint* (VAN'T VEER et al. 2002), é uma plataforma de microarranjos de DNA com 70 genes, com valor prognóstico para o risco de desenvolvimento de metástases à distância em pacientes sem comprometimento linfonodal. O segundo é o *Oncotype DX* (PAIK et al. 2004), um ensaio com 21 genes, avaliados por RT-PCR e destinado a prever eficácia de hormonioterapia, também em pacientes sem

comprometimento linfonodal. O uso destes testes é discutível e sua real aplicabilidade tem sido amplamente avaliada, porém indicam a grande necessidade de identificação de novos marcadores para uma classificação mais precisa do câncer de mama.

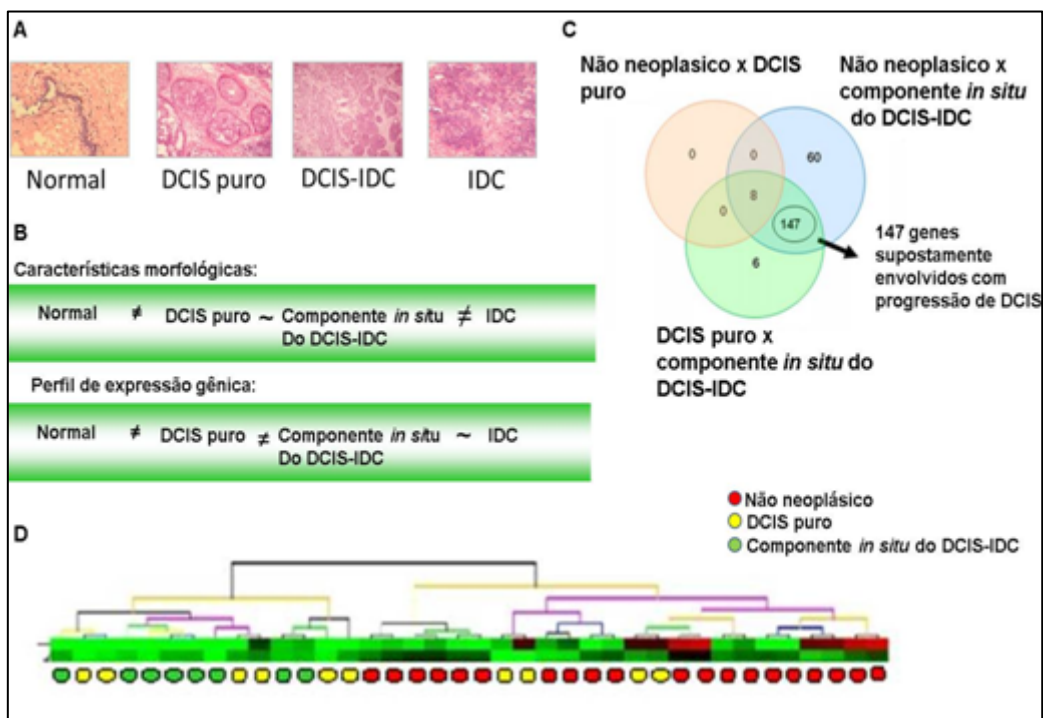
Muitos estudos tem tentado identificar um imunofenótipo molecular similar ao encontrado em análises por expressão gênica (NIELSEN et al. 2004; MATOS et al. 2005). A princípio, um painel composto por cinco marcadores (ER, PR, HER2, C5/6 e EGFR) parece conseguir categorizar lesões IDC de acordo com seus subtipos moleculares (CHEANG et al. 2008). Da mesma forma, há tentativas de estabelecer uma classificação baseada em subtipos moleculares para DCIS. Alguns estudos identificaram a existência de um subtipo basal em DCIS (LIVASY et al. 2007; MEIJNEN et al. 2008), enquanto outros não encontram evidências deste subtipo (HANNEMANN et al. 2006). CLARK et al. (2011) analisaram 188 lesões DCIS puro e definiram quatro diferentes subtipos baseados na expressão dos seguintes marcadores: ER, PR, HER2 e Bcl-2. O primeiro grupo (ER-, PR-, HER2+ e Bcl- 2-) foi quase exclusivamente associada a tumores de alto grau, presentes em 96% dos casos, e seria o correspondente ao subtipo HER2⁺. O segundo grupo (ER-, PR-, Her2- e Bcl-2-), também associado com alto grau, presente em 84% dos casos, corresponderia ao subtipo triplo negativo. O terceiro (ER+, PR+, HER2- e Bcl-2+) e o quarto grupos (ER+, PR+, HER2- e Bcl-2-) corresponderiam ao subtipo luminal A. Ainda, dentro destes últimos dois grupos, há um pequeno número de casos com ER+, PR+, HER2+, correspondentes ao subtipo luminal B. Este estudo

demonstrou que os subtipos intrínsecos identificados para IDC também podem ser encontradas em DCIS. Entretanto as frequências relativas de cada subtipo são diferentes entre DCIS e IDC (CLARK et al. 2011).

1.7 BUSCA DE NOVOS MARCADORES MOLECULARES PARA PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL DE MAMA

Para entender melhor as mudanças moleculares responsáveis pela invasão, a qual é a primeira etapa do processo de metástase, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um estudo com o objetivo de identificar marcadores associados à progressão tumoral em DCIS. Com o uso das técnicas de cDNA *microarray* e microdissecção a laser (LCM), foi investigado o padrão de expressão das células epiteliais do componente *in situ* e do componente invasivo da mesma lesão, encontrando pouca ou quase nenhuma diferença entre estes dois tipos de células (CASTRO et al. 2008). Estes resultados estão em concordância com dados da literatura (MA et al. 2003; PORTER et al. 2003; SCHUETZ et al. 2006). Assim, a próxima etapa foi comparar as células epiteliais de grupos que mimetizam a progressão do DC [normal, DCIS puro, componente *in situ* do carcinoma ductal que coexiste com o componente invasor (DCIS-IDC) e IDC] em amostras independentes (Figura 5A). O objetivo foi identificar qual o ponto da progressão do DC em que as células epiteliais tumorais exibiam as maiores diferenças moleculares que as tornavam aptas para adquirir capacidade para progredir de um câncer *in situ*, rompendo várias barreiras e culminando

no carcinoma invasivo. Entre as células neoplásicas, o perfil de expressão mais distinto foi observado entre as células epiteliais do DCIS puro e as células epiteliais do componente *in situ* do DCIS-IDC, o que contradiz aspectos morfológicos, já que estas são lesões de morfologia similar. Ainda, foi observada grande semelhança molecular entre as células epiteliais do componente *in situ* do DCIS-IDC e as células epiteliais do IDC (Figura 5B). Estes resultados sugerem que a aquisição da capacidade de invadir os tecidos adjacentes ocorre em nível molecular ainda quando as células se mantêm dentro dos ductos, ou seja, ocorre antes das modificações morfológicas do tecido. Explorando as diferenças entre as células epiteliais do DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-IDC, foi possível identificar um grupo de 147 genes diferencialmente expressos (Figura 5C) cujo padrão de expressão foi capaz de separar todas as amostras não neoplásicas e 60% das amostras representativas de DCIS puro de 100% das amostras representativas do componente *in situ* do DCIS-IDC (Figura 5D). Os genes diferencialmente expressos entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC estão possivelmente envolvidos na progressão do DC (CASTRO et al. 2008).



Fonte: CASTRO et al. (2008).

Figura 5 - Genes putativamente envolvidos com a progressão do carcinoma ductal de mama. (A), Grupos representativos da progressão do DC. (B), Comparação das características morfológicas e do perfil de expressão entre os grupos representativos da progressão do DC. (C), Diagrama em Venn mostrando os genes comuns e distintos nas comparações não neoplásico x DCIS puro, não neoplásico x componente *in situ* do DCIS-IDC e DCIS puro x componente *in situ* do DCIS-IDC. Para eliminar genes envolvidos com a formação do tumor daqueles envolvidos com a progressão, foram excluídos os oito genes diferencialmente expressos entre não-neoplásico x DCIS puro. Os genes diferencialmente expressos entre o componente *in situ* do DCIS-IDC e o não neoplásico ou DCIS puro (147 genes) podem estar potencialmente envolvidos com a progressão do DCIS. (D), Dendrograma baseado no perfil de expressão dos 147 genes identificados. Abreviações: DC, carcinoma ductal de mama; DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; IDC, carcinoma ductal invasivo.

Desta forma, os genes encontrados diferencialmente expressos entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC são potenciais marcadores moleculares de predição de doença invasiva e foram avaliados em maior profundidade pelo presente estudo, com o objetivo de identificar candidatos envolvidos com a progressão do DCIS. Ainda, no contexto de progressão do DC, foi testado o potencial destes genes como fatores prognósticos em IDC, o que pode auxiliar na estratificação destes casos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar genes diferencialmente expressos entre células epiteliais tumorais do DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-IDC e testar o potencial destes genes como marcadores moleculares preditores de progressão do carcinoma ductal *in situ*, assim como marcadores prognósticos em IDC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar os genes previamente identificados como diferencialmente expressos entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC pela técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR);
- Validar a expressão proteica dos genes confirmados pela técnica de RT-qPCR por imunohistoquímica utilizando *Tissue microarray* (TMA);
- Testar o potencial dos genes candidatos como biomarcadores preditivos de progressão de DCIS ou como biomarcadores prognósticos em IDC;
- Investigar o papel funcional de alguns dos potenciais biomarcadores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Neste estudo, foram utilizadas amostras de DCIS puro, amostras com o componente *in situ do* DCIS-IDC, amostras de IDC e amostras de tecido não neoplásico (borda de fibroadenoma). Para as lesões DCIS puras, todas as lâminas de cada caso foram examinadas pela patologista Dra. Cynthia Osório, para verificar a presença de possíveis microinvasões, não previamente identificadas. A classificação das amostras DCIS puro seguiu os parâmetros estabelecidos pela OMS. Para a classificação das amostras IDC, foi utilizado o sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (SBR modificado).

As amostras foram obtidas do banco de tumores e do arquivo do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Para as amostras neoplásicas, o critério de inclusão foi o diagnóstico de carcinoma ductal sem tratamento sistêmico pré-operatório.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo, no processo de número 1143/08.

3.2 MICRODISSECÇÃO A LASER

As amostras, utilizadas na validação por RT-qPCR, foram microdissecadas a laser, com a utilização do equipamento *Pixcell II Laser Capture Microdissection System* (Arcturus®) para captura das células epiteliais tumorais de cada lesão. O procedimento de captura da célula de interesse por microdissecção a laser foi realizado pela Dra. Cynthia Osório, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C Camargo. O número de células capturadas variou para cada lesão, de 1000 a 4000 células. Uma representação da microdissecção a laser pode ser visualizada na Figura 6.

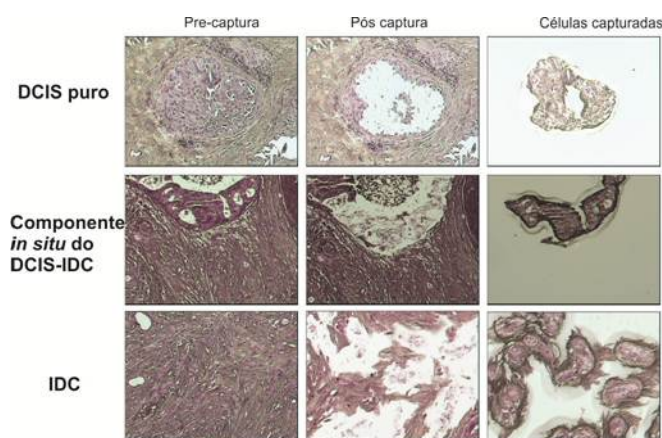


Figura 6 - Células tumorais epiteliais capturadas de lesões DCIS puras, componente *in situ* do DCIS-IDC e IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; IDC, carcinoma ductal invasivo. Aumento de 100 x.

3.2.1 Extração e amplificação do RNA das células microdissecadas a laser

Imediatamente após a microdissecção a laser, o RNA total das amostras foi extraído com kit *PicoPure RNA Isolation* (Acturus®) e tratado com DNase (Qiagen®), segundo as recomendações do fabricante. Após a extração, a qualidade do RNA total foi avaliada pelo aparelho *Agilent 2100 Bioanalyser* (Agilent Technologies®), utilizando o kit *RNA 6000 Pico LabChip* (Agilent Technologies®). O software do equipamento calcula a proporção entre as bandas ribossomais 18S e 28S para amostras eucarióticas. É construído um eletroferograma e calculado um número de integridade do RNA (*RIN-RNA Integrity Number*) que varia de 0 a 10. Um exemplo da qualidade do RNA total, extraído das amostras microdissecadas a laser, está representado na Figura 7A.

Na sequência, o RNA mensageiro (RNAm) foi submetido a dois ciclos de amplificação, conforme descrito em CASTRO et al. (2008). O protocolo detalhado está descrito no Anexo 1. A concentração do RNA amplificado (RNAa) foi verificada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®). A integridade do RNAa foi avaliada pelo aparelho *Agilent 2100 Bioanalyser* (Agilent®), utilizando o kit *RNA 6000 Nano LabChip* (Agilent®). As amostras devem apresentar um perfil de amplificação onde a maior concentração de RNA amplificado (RNAa) esteja entre 200 a 600pb. Um exemplo da qualidade do RNAa pode ser visualizado na Figura 7B.

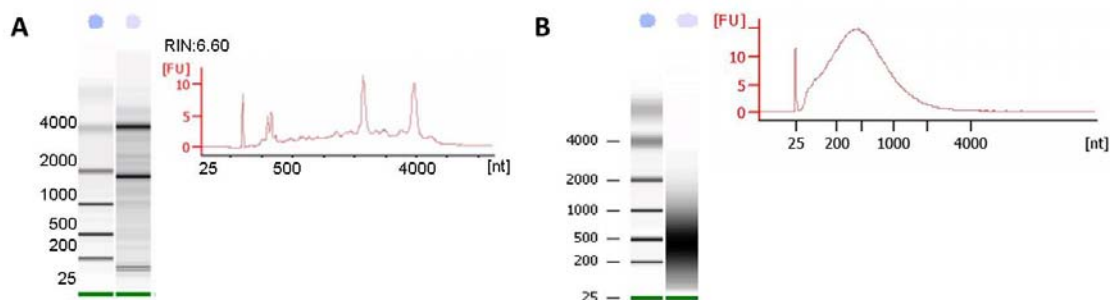


Figura 7 - Corrida de RNA total e amplificado no equipamento *Bioanalyser*. (A), eletroforese e eletroferograma de RNA total. (B), eletroforese e eletroferograma de RNA amplificado.

3.3 MICRODISSECÇÃO MANUAL E EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DE AMOSTRAS IDC

Amostras de tecido congelado de IDC foram manualmente microdissecadas para o enriquecimento de pelo menos 70% das células tumorais. DNA e RNA total foram simultaneamente extraídos. Primeiramente, 30 mg de tecido congelado fresco foram homogeneizados utilizando o equipamento Precellys (Precellys®) em 600µl de tampão RLT e o lisado centrifugado por 3 minutos em alta rotação. O sobrenadante foi utilizado para extração de RNA com utilização de *RNeasy Mini Kit* (Qiagen®). O precipitado foi utilizado para a extração de DNA, por incubação por aproximadamente 12 horas a 55°C, com o tampão de digestão (EDTA 25mM pH8; sodium dodecylsulphate 20%; NaCl 100 mM; Tris-HCl 100mM e 300ug proteinase K), seguido por precipitação com etanol absoluto e lavagens com etanol 70%. Por último, o DNA foi recuperado em Tris-EDTA pH 8.0.

3.4 TRATAMENTO DE RNA TOTAL COM DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com uma unidade da enzima DNase I (Ambion®), por 30 min a 37⁰C, segundo as especificações do fabricante. Para checar a eficiência do tratamento e ausência de DNA genômico nas amostras, foi feita uma reação de PCR com iniciadores localizados nos íntrons do gene MLH1 (iniciador *forward*: TGGTGTCTCTAGTTCTGG e iniciador *reverse*: CATTGTTGTAGTAGCTCTGC), com a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®), segundo as recomendações do fabricante. Os produtos de amplificação foram avaliados em gel de poli-acrilamida 8%, corado com nitrato de prata. A ausência de amplificação de um produto de 254pb confirma a eficácia do tratamento. Como controle positivo da reação de PCR, foi utilizado DNA genômico da linhagem celular de mama C5.2.

3.5 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNAa ou de RNA total. As reações foram feitas em volume final de 20µl, com oligonucleotídeos iniciadores (*random* dN6 para síntese de cDNA a partir de RNAa e Oligo dT-18 para síntese de cDNA a partir de RNA total). Para a transcrição reversa foi utilizada a enzima Superscript III (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante.

3.6 VALIDAÇÃO DOS DADOS DE cDNA *MICROARRAY* POR RT-qPCR

Para a validação dos dados do experimento de cDNA *microarray* (CASTRO et al. 2008), por RT-qPCR, foram utilizados os sistemas de detecção *Taqman* e *SYBR green*. A validação foi realizada em um grupo de amostras semi-independentes, onde parte do *set* amostral foi composto pelas mesmas amostras utilizadas no experimento de cDNA *microarray* e outra parte composta por novos casos, adicionados para a análise de RT-qPCR. Foram selecionadas amostras de tecido congelado, microdissecadas a laser para a captura das células epiteliais de: nove amostras DCIS puro, 19 componente *in situ* do DCIS-IDC, 12 IDC e quatro normais (bordas de fibroadenoma). Todos os casos são provenientes do Biobanco do Hospital A.C Camargo. As características clinico-patológicas destes casos estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Características clínico-patológicas dos casos selecionados para a validação por RT-qPCR.

Tipo histológico	Amostra	Idade ao diagnóstico	pTNM	Grau nuclear	Grau de SBR	Marcadores moleculares	Sistema de detecção por RT-qPCR
Normal	MN14	25	NA	NA	NA	NA	TLDA
	MN16	29	NA	NA	NA	NA	TLDA
	MN18	29	NA	NA	NA	NA	TLDA
	MN19	44	NA	NA	NA	NA	TLDA
DCIS puro	43A	37	TisN0M0	3	NA	ER -/PR -/P53 +/ HER2 ND	SYBR-Green/TLDA
	44A	44	TisN0M0	2 e 3	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER2 (0)	SYBR-Green/TLDA
	46A	43	TisN0M0	3	NA	ER +/ PR+/ P53-/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	48A	52	TisN0M0	3	NA	ER +/ PR+/ P53-/ HER2 (3+)	SYBR-Green
	49A	58	TisN0M0	3	NA	ER-/ PR-/P53-/HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	M60T	65	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)	TLDA
	M27T	42	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (0)	TLDA
	M56T	48	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)	TLDA
	M58T	58	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)	TLDA
	M59T	54	TisN0M0	3	NA	ER-/PR-/ HER2(3+)	TLDA

Cont/ Quadro 2

Tipo histológico	Amostra	Idade ao diagnóstico	pTNM*	Grau nuclear	Grau de SBR	Marcadores moleculares	Sistema de detecção por RT-qPCR
Componente <i>in situ</i> do DICS-IDC	2A	48	T2N0M0	3	NA	ER +/PR +/P53 +/HER2 (1+)	SYBR-Green/TLDA
	13A	75	T2N0M0	2	NA	ER +/PR +/P53 +/HER2 (2+)	SYBR-Green
	25A	34	T1cN0M0	3	NA	ER +/PR +/P53 +/HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	45A	55	T1N0M0	3	NA	ER -/PR -/P53 +/HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	66A	44	T4bN1M0	2	NA	ER +/PR +/P53 ND/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	69A	57	T2N2M0	2	NA	ER +/PR +/P53 ND/ HER2 (2+)	SYBR-Green
	75A	43	T2N0M0	2	NA	ER -/ PR -/ P53 +/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	83A	48	T2N0M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	85A	73	T3N0M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER (2+)	SYBR-Green/TLDA
	86A	46	T2N1M0	3	NA	ER +/ PR + P53 +/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	87A	48	T2N1M0	3	NA	ER -/ PR -/ P53 -/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	88A	63	T2N0M0	1	NA	ER +/ PR -/ P53 -/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	3N0	39	T1cN0M0	3	NA	ER +/ PR+/ P53 ND/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	8N0	49	T1cN0M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 ND/ HER2 (0)	SYBR-Green/TLDA
	15N1	69	T2N1M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 ND/ HER (2+)	SYBR-Green/TLDA
	MIC 25A	54	ND	3	NA	ER-/PR+/HER2 (1+)	TLDA
	MIC 38A	67	ND	3	NA	ER+/PR+/HER2 (1+)	TLDA
	MIC 81A	56	ND	2	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)	TLDA
	MIC 151A	56	ND	3	NA	ER-/PR+/ HER2 (3+)	TLDA

Cont/ Quadro 2

Tipo histológico	Amostra	Idade ao diagnóstico	pTNM	Grau nuclear	Grau de SBR	Marcadores moleculares	Sistema de detecção por RT-qPCR
IDC	1B	45	T2N0M0	2	II	ER -/ PR -/ P53 -/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	3B	43	T1cN0M0	3	II	ER +/ PR -/ P53 -/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	15B	47	T2N1M0	2	I	ER+/PR+/HER2 (3+)	SYBR-Green
	24B	54	T2N0M0	3	II	ER +/ PR +/ P53 +/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	50B	71	T4N2M0	3	III	ER +/ PR +/ P53 +/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	51B	43	T2N0M0	3	III	ER -/ PR ND/ P53 ND/ HER2 (3+)	SYBR-Green
	53B	43	T2N2M0	3	III	ER +/ PR +/ P53 ND/ HER2 (2+)	SYBR-Green/TLDA
	56B	ND	ND	ND	ND	ER ND/ PR ND/ P53 ND/ HER2 ND	SYBR-Green/TLDA
	63B	54	T3N1M0	3	III	ER -/ PR - P 53 -/ HER2 (1+)	SYBR-Green/TLDA
	80B	44	T1N1M0	3	II	ER +/ PR + P53 -/ HER2 (1+)	SYBR-Green/TLDA
	81B	31	T2N1M0	3	II	ER -/ PR -/ P53 +/ HER2 (3+)	SYBR-Green/TLDA
	MIC 177B	43	ND	3	ND	ER-/PR-/HER2 (1+)	TLDA

Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; IDC, carcinoma ductal invasivo; pTNM, sistema TNM patológico para classificação de tumores malignos; ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; HER2, *human epidermal growth factor receptor type 2*; Grau de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson; ND, não determinado; NA, não aplicável, TLDA, *taqman low density array*. (*), a avaliação do pTNM das amostras DCIS-IDC foi feita de acordo com a lesão invasiva.

3.6.1 Validação dos dados de cDNA *microarray* utilizando o sistema *Taqman*

Para a validação utilizando o sistema *Taqman*, foram escolhidos 61 dos 147 genes, previamente reportados como diferencialmente expressos entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC (CASTRO et al. 2008) (Anexo 2). Nove amostras de DCIS puro, 17 amostras componente *in situ* do DCIS-IDC, 10 amostras IDC e quatro normais (Quadro 2) foram avaliadas através do ensaio *Taqman low density array* (TLDA). Os ensaios foram realizados conforme instruções do fabricante, com 20ng de cDNA de cada amostra convertidos a partir de aRNA, no equipamento Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies®).

3.6.2 Validação dos dados de cDNA *microarray* utilizando o sistema *SYBR green*

Na validação pelo o sistema *SYBR green*, oito genes entre os 61 escolhidos, foram avaliados por RT-qPCR, em cinco amostras de DCIS puro, 15 componente *in situ* de DCIS-IDC e 10 IDC (Quadro 2). Para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, utilizou-se o programa *OLIGOTECH* versão 1.00 (Copyright© 1995). Para todos os candidatos, foi realizada uma etapa de padronização prévia por RT-PCR, seguida por corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8%. O cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores foi obtida através da utilização de cinco diferentes concentrações de cDNA (8ng, 2ng, 0,5ng, 0,125ng e 0,031 ng) obtidas a partir de diluição seriada da linhagem C5.2. As reações foram realizadas em triplicata para

cálculo da eficiência de amplificação segundo a fórmula: $(E_f = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1)$, onde *slope* corresponde ao coeficiente angular da reta obtida pela variação do *Cycle quantification* (Cq) em função do *log* das diferentes quantidades de cDNA. O Quadro 3 mostra o tamanho do produto amplificado, sequência, eficiência de amplificação, temperatura de pareamento e concentração final dos oligonucleotídeos iniciadores, utilizadas nas reações de RT-qPCR com o sistema de detecção com *SYBR green*.

As reações foram feitas em volume final de 20 μ l contendo 10 μ l de *SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies®), 200nM, 400nM, 800nM ou 1200nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e aproximadamente 5 ng de cDNA convertido a partir de RNAa ou aproximadamente 50 ng de cDNA convertido a partir de RNA total. Em todas as análises, foi obtida a curva de dissociação, utilizada para confirmar a especificidade da amplificação. As reações foram feitas em duplicatas em placas de 96 *wells MicroAmp Optical* (Life Technologies®) e os valores de desvio padrão acima de 0,6 entre as duplicatas foram desconsiderados e a reação, quando possível, repetida. Em cada placa, foram utilizadas amostras de cDNA de linhagens celular de mama HB4a ou C5.2, como calibradoras do experimento. A ciclagem de cada reação consistiu em 10 minutos a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaQ Gold DNA Polymerase*, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um minuto a 60°C para o pareamento dos iniciadores e extensão. Ao final da amplificação foi adicionada uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C, para obter uma curva de

dissociação, utilizada para confirmação da especificidade da amplificação. Os dados de quantificação foram analisados pelo software de análise do aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies®).

Quadro 3 - Sequência, tamanho esperado do produto amplificado, eficiência, temperatura de pareamento e concentração dos oito oligonucleotídeos iniciadores desenhados para as reações de RT-qPCR com o sistema *SYBR green*.

Gene	Tamanho do amplificado (pb)	Oligonucleotídeo iniciador – <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleotídeo iniciador – <i>Reverse</i> (5'-3')	Eficiência de amplificação	Temperatura de pareamento dos iniciadores na reação de RT-qPCR (°C)	Concentração final de oligonucleotídeos iniciadores nas reações de RT-qPCR
<i>ADFP</i> (GenBank:NM_001122.2)	122	GATACTGATGAG TCCCCTG	GGTACACCTTGG ATGTTGG	1,03	62	400nM
<i>ANAPC13</i> (GenBank:NM_015391.3)	146	GATTGATGATGC TTGGCG	GTAAGGCTAAGT CTGTCC	0,88	60	200nM
<i>ARHGAP19</i> (GenBank:NM_032900)	80	CAAGATTGAAGT GGTCTGAAG	GGACCATAGGAG ACAACCTC	1,00	60	800nM
<i>CLTCL1</i> (GenBank:NM_001835.3)	98	GATGGGCATGAA TGAGAC	CGAAGTTGGGAG CAGAG	0,97	60	200nM
<i>CPNE3</i> (GenBank:NM_003909.3)	127	GATGGTGATGGT GGAAGTC	CTGCCAAGACAC ACTGAG	1,04	62	400nM

Cont/ Quadro 3

Gene	Tamanho do amplificado (pb)	Oligonucleotídeo iniciador – Forward (5'-3')	Oligonucleotídeo iniciador – Reverse (5'-3')	Eficiência de amplificação	Temperatura de pareamento dos iniciadores na reação de RT-qPCR (°C)	Concentração de oligonucleotídeos iniciadores nas reações de RT-qPCR
<i>IMMT</i> (GenBank:NM_006839.2)	112	GATCACTTGCGA GATGTCC	GACTGAGACGAC GAAATTG	1,01	62	800nM
<i>NGDN</i> (GenBank:NM_001042635.1)	76	CGTTTTAAGCCTC ATCCCAG	CATCTTCTGCTTC ATCTTCCTC	1,00	60	800nM
<i>PIAS2</i> (GenBank: NM_0046712)	88	GACCGAAGAAAG AAGCTATG	GTCACTGAACAA GGCTTAC	1,00	60	1200nM

3.6.3 Cálculo de expressão relativa para os ensaios de RT-qPCR

A expressão dos transcritos alvos foi determinada através da quantificação relativa a um gene endógeno ou normalizador. Para a seleção do gene ou genes normalizadores mais estáveis no grupo de amostras analisado, foi utilizada uma ferramenta online, denominada geNorm (VANDESOMPELE et al. 2002), disponível em <<http://medgen.urgent.be/~jvdesomp/genorm/>>, a qual calcula uma medida de estabilidade gênica (M). O valor M sugerido pelo programa deve ser menor que 1.5, abaixo do qual se tem os genes endógenos mais estáveis. Foram analisados seis genes endógenos: *ACTB*, *BCR*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* e *RPLP0*. A média entre os genes mais estáveis foi utilizada nos cálculos de expressão relativa, o qual foi feito com base no modelo matemático descrito por PFAFFL (2001).

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE CANDIDATOS PREVIAMENTE VALIDADOS POR RT-qPCR

3.7.1 Construção dos *Tissue Microarrays* (TMAs)

Para as reações de IHQ, foram construídos dois *Tissue microarrays* (TMAs). Foram selecionadas as áreas representativas de cada neoplasia, as quais foram identificadas nos blocos de parafina e puncionadas com agulha de um milímetro. Os cilindros obtidos foram transferidos de cada bloco doador para um bloco de parafina receptor. Foram coletadas amostras em duas diferentes áreas do bloco original para confecção de duplicatas no

bloco receptor. Os blocos de TMA foram cortados em micrótomo rotativo, com espessura de três μm para confecção das lâminas para as reações de IHQ.

3.7.2 Caracterização dos TMAs por imunistoquímica (IHQ) e Fluorescence *In situ* hybridization (FISH)

Os candidatos validados por RT-qPCR foram avaliados por IHQ em um grupo independente de amostras de tecidos tumorais fixados por formaldeído e emblocados em parafina (FFPE). Foram construídos dois TMAs (item 3.7.1). O primeiro (TMA1) foi composto por 41 amostras de DCIS puro e 36 amostras componente *in situ* do DCIS-IDC (TMA 1). Os candidatos que apresentaram expressão proteica entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC concordantes com os dados de RMAm foram avaliados em um segundo TMA, composto por 304 amostras FFPE de IDC (TMA2), para verificar o potencial prognóstico em IDC. As amostras são provenientes do arquivo de anatomia patológica do Hospital A.C. Camargo.

As amostras de ambos os TMAs foram previamente analisadas por IHQ para a expressão dos marcadores hormonais ER (anti-ER, monoclonal, clone SP1, produzido em coelho, DAKO®) e PR (anti-PR, monoclonal, clone PgR636, produzido em camundongo DAKO®), assim como do marcador HER2 (anti-HER2, policlonal, produzido em coelho, 1:1000, DAKO®). ER, PR e HER2 foram avaliados segundo as recomendações da *American Society of Clinical Oncology* e do *College of American Pathologists* (WOLFF et al. 2007 e HAMMOND et al. 2010). Para o TMA 2, foi também feita

análise de EGFR (monoclonal, 1:80, Novocastro®) e CK5/6 (pronto para uso, Dako®). A positividade de EGFR e C5/6 foi considerada quando observada em pelo menos 1% das células neoplásicas. Na Tabela 1, são descritas as características clinico-patológicas dos casos dos TMAs 1 e 2.

As amostras do TMA 2 com resultado de IHQ (2+) para HER2 foram avaliadas por FISH. Para as reações de FISH, as lâminas foram desparafinizadas em xilol com três banhos de 10 minutos cada. Foram então realizados três passagens em álcool e em água destilada, por cinco e dois minutos, respectivamente. As lâminas foram lavadas em solução de HCL (0.2N) por 20 minutos a temperatura ambiente (TA) e pré-tratadas em citrato pH 6.0 – 8.0, em banho maria por uma hora. A digestão enzimática foi realizada com pepsina por sete minutos e na sequência, uma lavagem em solução 2X SSC por dois minutos a TA. As lâminas foram desidratadas em álcool 75%, 80%, 100% por dois minutos cada e secadas a TA. Foi então aplicado 10µl da sonda para HER2 e feita a incubação no forno de hibridização para desnaturação e hibridação por cerca de 12 horas. Na sequência, as lâminas foram pré-aquecidas em solução de UREA 1,5M /0,1x SSC em banho-maria à 45°C, depois mergulhadas na mesma solução a 45°C por 30 minutos e lavadas em solução de 2x SSC por dois minutos à TA. Novamente foram desidratadas em álcool 75%, 80% e 100% por dois minutos cada e secadas a TA. Por último, foram aplicados 15µl de DAPI e feita a montagem da lamínula. Os casos foram analisados pela Dra. Isabela Werneck da Cunha, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos casos dos TMA1 e TMA2.

Variável	Categoria	TMA 1 (DCIS puro e DCIS-IDC), n (%) ¹	TMA 2 amostras IDC), n (%) ¹
Idade	≤45	19 (35,20)	74 (24,90)
	>45	35 (64,80)	223 (75,10)
Tipos histológicos	DCIS puro	41 (53,20)	NA
	Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	36 (46,80)	NA
	IDC	NA	304 (100,00)
Subtipo histológico	Não comedo	62 (82,70)	NA
	Comedo	13 (17,30)	NA
Grau nuclear	1	4 (5,60)	5 (1,70)
	2	33 (46,50)	91 (30,70)
	3	34 (47,90)	200 (67,60)
Grau histológico	Não alto grau	34 (51,50)	NA
	Alto grau	32 (48,50)	NA
Grau de SBR	1	NA	56 (18,90)
	2	NA	164 (55,40)
	3	NA	76 (25,70)
Estadio clínico	I+II	NA	112 (38,00)
	III+IV	NA	183 (62,0)
Receptor de estrógeno	Negativo	22 (32,80)	94 (33,20)
	Positivo	45 (67,20)	189 (62,20)
Receptor de progesterona	Negativo	31 (46,27)	150 (49,30)
	Positivo	36 (53,73)	120 (39,50)
HER2	Negativo	11 (16,70)	242 (79,60)
	Positivo	55 (83,30)	50 (16,40)

Cont/ Tabela 1

Variável	Categoria	TMA 1 (DCIS puro e DCIS-IDC), n (%) ¹	TMA 2 amostras IDC), n (%) ¹
CK5/6	Negativo	ND	225 (76,80)
	Positivo	ND	68 (23,20)
EGFR	Negativo	ND	195 (67,50)
	Positivo	ND	94 (32,50)
Número de linfonodos comprometidos	≤3	NA	164 (62,10)
	>3	NA	100 (37,90)
Quimioterapia adjuvante	Não	NA	144 (47,40)
	Sim	NA	114 (37,50)
Radioterapia	Não	ND	67 (26,00)
	Sim	ND	191 (74,00)
Hormonioterapia	Não	ND	147 (57,00)
	Sim	ND	111 (43,00)

Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ* puro; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; IDC, carcinoma ductal invasivo; Grau de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson; HER2, *Human epidermal growth factor receptor type 2*; CK, citoceratina; EGFR, *epidermal growth factor receptor*, NA, não aplicável; ND, não determinado; TMA, *tissue microarray*. (¹) Percentual considerando número de casos com informação completa.

As amostras IDC foram classificadas como Luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2-), Luminal B (ER+ e/ou PR+, HER2+), HER2+ (ER-,PR-,HER2+), basal ([ER-,PR-,HER2-, citoceratina (CK) 5/6+ e/ou EGFR+] ou não classificáveis (negativas para os cinco marcadores) (PEROU et al. 2000; (KHRAMTSOV et al. 2010).

3.7.3 Reações de Imunoistoquímica (IHQ)

As reações de IHQ foram realizadas utilizando o sistema de polímero Advance (DAKO®). Os cortes foram desparafinizados através de três trocas de xilol de cinco minutos a TA. A seguir os cortes foram hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e posteriormente lavados em água corrente por cinco minutos. A recuperação antigênica foi feita através do calor com irradiação por panela de pressão utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0 ou EDTA pH 9.0, segundo a padronização estabelecida para cada anticorpo. Então, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10V) com três trocas de cinco minutos cada. Após o bloqueio da peroxidase, também se fez o bloqueio de proteína (*Protein Block Serum-Free*) (DAKO®) por 20 minutos, seguidos por três lavagens de cinco minutos com PBS.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários de cada proteína por 18 a 20 horas em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de cinco minutos cada. A seguir, foram incubadas com o pós-primário, *Advanced HRP Link* (DAKO®), por 30 minutos a TA, seguido por três lavagens de cinco minutos em PBS, e incubação com o polímero *Advanced* (DAKO®) por 30 minutos a TA. Os cortes foram então lavados com três trocas de PBS, revelados com solução de Diaminobenzidina (DAB) (DAKO®) e contra corados com hematoxilina de Harris (Merck®).

Neste estudo, foram analisados os seguintes anticorpos: anti-ADFP (monoclonal, clone aa5-27, produzido em camundongo, 1:50, Life Span Biosciences®, reativação antigênica em Tris EDTA pH9.0); anti-ANAPC13 (policlonal, produzido em coelho, 1:30, Sigma Aldrich®, reativação antigênica em Citrato pH 6.0); anti-ANAPC13 (policlonal, produzido em coelho, 1:300, Life Span Biosciences®, reativação antigênica em Citrato pH 6.0); anti-ARHGAP19 (policlonal, produzido em cabra, 1:50, Santa Cruz®, reativação antigênica em Tris EDTA pH9.0); anti-CLTCL1 (monoclonal, clone 2Q2166, produzido em camundongo, 1:300, Abcam®, reativação antigênica em Citrato pH 6.0); anti-LOX (policlonal, produzido em coelho, 1:300, Abcam®, reativação antigênica em Tris EDTA pH9.0; e anti-SULF1 (policlonal, produzido em coelho, 1:50, Abcam®, reativação antigênica em Tris EDTA pH9.0). Como controles positivos, foram utilizadas tecidos conhecidos por expressarem as proteínas de interesse, segundo as informações disponíveis no Atlas de Proteína Humana, disponível em <http://www.proteinatlas.org/>. Um controle negativo, feito pela omissão do anticorpo primário, foi incluído em todas as reações.

Os resultados foram analisados em microscópio óptico pelo Dr. Rafael Malagoli Rocha e pela Dra. Cynthia Osório e classificados em relação à intensidade da reação, à porcentagem de células positivas e ao padrão de marcação. Marcação nuclear e/ou citoplasmática foram consideradas para a análise quando presentes em pelo menos 10% das células.

A marcação nuclear foi classificada segundo o escore de Allred (0-8) (ALLRED et al. 1998). As amostras foram categorizadas como negativas (escores 0-3) e positivas (escores 4-8).

A marcação citoplasmática foi classificada segundo a intensidade em: ausente, fraca, moderada e forte. Para determinar a correspondência entre a expressão de RNAm e proteína, as amostras foram categorizadas como negativas (ausência de marcação e/ou intensidade fraca) e positivas (intensidade moderada e/ou forte). Para avaliação do potencial prognóstico dos marcadores estudados, as amostras foram categorizadas em negativas (ausência de marcação) e positivas (intensidade fraca, moderada ou forte).

3.8 AVALIAÇÃO DE CANDIDATOS A MARCADORES MOLECULARES PARA PREDIÇÃO DE INVASÃO EM DCIS

Os candidatos a marcadores moleculares de predição de invasão em DCIS (*ANAPC13*, *CLTCL1* e *SULF1*) foram avaliados por IHQ em um grupo de amostras de DCIS que apresentaram ou não um segundo evento (considerado como recidiva local e/ou progressão para doença invasiva e/ou metastática) ao longo de pelo menos seis anos de seguimento. Para esta análise, foram avaliados os cortes inteiros da neoplasia de: 10 casos DCIS que apresentaram recidiva local ou progressão para doença invasiva e/ou metastática; 25 casos DCIS que não apresentaram recidiva ou progressão da doença ao longo do tempo de seguimento.

3.9 RASTREAMENTO DE MUTAÇÃO NO GENE *ANAPC13*

O DNA tumoral de 42 amostras de tecido congelado de IDC foi avaliado através de sequenciamento pelo sistema de Sanger. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores, os quais podem ser visualizados no Quadro 4, juntamente com suas condições de padronização. Os produtos de PCR foram confirmados por gel de agarose 1% e sequenciados no equipamento 3130 XL Genetic Analyzer (Life Technologies®). Para todas as amostras, sequências *forward* e *reverse* de cada fragmento foram alinhadas à referência Refseq NM_015391.3 e analisadas utilizando o programa CLC DNA Genomics Workbench (CICbio®).

Quadro 4 - Oligonucleotídeos desenhados para rastreamento de mutação em *ANAPC13*.

Tamanho do amplificado	Oligonucleotídeo iniciador (Forward) 5'-3'	Oligonucleotídeo iniciador (Reverso) 5'-3'	Condições de padronização
579 pb	(ANAPC13-1) CCAGCCTCTGTAGTCGG	(ANAPC13-2) GGGACACGTCTTATCAATTC	MgCl ₂ (1,5mM), T= 58 ^o C
482bp	(ANAPC13- 3)- GTACGGTGCGGATGGTG	(ANAPC13 4) CAGGGCACACTGATTATCTTG	MgCl ₂ (1,5mM), T= 58 ^o C
410 bp	(ANAPC13- 5) GGAGAGAGGAACTGTGATC	(ANAPC13- 6) GTTAGAGAATTCCACAGCTTTG	MgCl ₂ (1,5mM), T=62 ^o C
576 bp	(ANAPC13- 7) CCTAGGAACTCACAAGC	(ANAPC13-8) GCCTTCCCTCTCATA	MgCl ₂ (3mM), T=60 ^o C
742 bp	(ANAPC13- 9) GCTGTCAAAGTTTAACACC	(ANAPC13-10)- GGATGTATCTGGATTATAGG	MgCl ₂ (3mM), T=60 ^o C

3.10 ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (aCGH)

O DNA de 33 das 42 amostras IDC (item 3.9) foi utilizado para a investigação de alterações cromossômicas através da técnica aCGH, utilizando plataformas de *microarray Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarrays* (Agilent Technologies®), com 8x60K, contendo 60.000 sondas de oligonucleotídeos e 4x180K, contendo 180.000 sondas de oligonucleotídeos (Agilent Technologies®). As amostras foram marcadas com Cy3- and Cy5-dCTPs, com o uso de oligonucleotídeos randômicos. As etapas de purificação, hibridização e lavagens foram realizadas conforme recomendações do fabricante. As reações de aCGH foram analisadas pela Dra. Ana Krepischi, do laboratório de Genética do Câncer, do Hospital A.C. Camargo.

3.11 CULTIVO CELULAR

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares de mama normais (HB4a e MCF-10A) e tumorais (C5.2, MCF-7, MDA-MD-231, SK-BR-3) e a linhagem tumoral de rim (HEK-293).

As linhagens celulares foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, em meio de cultivo celular específico (Invitrogen®). Para MCF-10A, o meio DMEM/F12 foi acrescido de insulina (10µg/mL), EGF (20ng/mL), hidrocortisona (0,5 µg/mL) e toxina colérica (100ng/mL). Para HB4a e C5.2, foi utilizado o meio RPMI acrescido de

insulina (10µg/mL) e hidrocortisona (0,5 µg/mL). Para MCF-7 e SK-BR-3, utilizou-se o meio McCoy's, com insulina (10µg/mL) apenas no cultivo da MCF-7. Para MDA-MB-231, foi utilizado o meio Lebovitz. Para HEK-293, foi utilizado o meio DMEM. Todos os meios foram acrescidos de 1% de L-glutamina, 10% de soro bovino fetal (SFB) e penicilina-estreptomicina (50µg/mL) (Invitrogen®), com exceção da linhagem MCF-10A, para a qual foram acrescidos 5% de SFB.

3.12 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DAS LINHAGENS CELULARES

O DNA e RNA total das linhagens foram extraídos utilizando *DNA purification kit* (Promega®) e *RNeasy Mini kit* (Qiagen®), respectivamente. RNA total foi tratado com DNase, conforme descrito no item 3.4

3.13 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA POR METILAÇÃO DO DNA NA EXPRESSÃO DE *ANAPC13*

Foi investigado o efeito da regulação epigenética, por metilação do DNA na expressão de *ANAPC13* em linhagens celulares de mama tumoral (MCF-7) e normal (MCF-10A) e em uma linhagem tumoral de rim (HEK-293), tratadas e não tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Durante cinco dias, as células foram cultivadas com meio completo acrescido de 5µM do agente desmetilante. A cada 24 horas o meio de cultura era trocado por meio fresco acrescido do agente. Como controle do

tratamento, as mesmas células foram cultivadas simultaneamente, nas mesmas condições, exceto pela adição do agente desmetilante. O tratamento foi realizado em duplicada e o RNA total destas células foi extraído conforme descrito no item 3.12. As linhagens foram avaliadas através da análise por RT-qPCR, utilizando sistema *SYBR green*.

3.14 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE VARIANTES DE *SPLICING* DO GENE *ANAPC13*

Para estudar a presença das variantes de *splicing* de *ANAPC13*, as linhagens celulares normais (HB4a e MCF-10A) e tumorais de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3) e 40 das 42 amostras IDC foram avaliadas por RT-PCR. Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados, permitindo a amplificação das três variantes, conhecidas até o momento, através da detecção do tamanho do produto amplificado (Quadro 5).

Quadro 5 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para investigação do perfil de expressão de variantes de *splicing* de *ANAPC13*.

Oligonucleotídeo iniciador (<i>Forward</i>) 5'-3'	Oligonucleotídeo iniciador (<i>Reverso</i>) 5'-3'	Tamanho do amplificado (em pb)
F1, 2 e 3- GCAGGAGCAAGCGTC	R* CTCACTGTCCATTTTCCTGC	Variante 1: 707
		Variante 2: 326
		Variante 3: 75
F1 - CCATGCTCTGTGCTTAGG	R* CTCACTGTCCATTTTCCTGC	Variante 1: 225
		Variante 2: não amplifica
		Variante 3: não amplifica
F1 e 2- CGTTCGTTGCTCAGTGTC	R* CTCACTGTCCATTTTCCTGC	Variante 1: 623
		Variante 2: 242
		Variante 3: não amplifica

Os oligonucleotídeos *forward* foram desenhados de forma a amplificar uma, duas ou as três variantes. O oligonucleotídeo reverso (R*) foi desenhado em uma região comum às três variantes.

Na reação com os iniciadores (F1, 2 e 3) e (R*) foi utilizada a enzima GoTaq DNA Polimerase (Promega®). Para as demais reações, foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®). As reações de amplificação foram feitas seguindo as recomendações dos fabricantes, utilizando concentração final de 2mM de MgCl₂ a 94⁰C por três minutos, seguidos de 40 ciclos térmicos de 94⁰C por 30 segundos (desnaturação), 58⁰C por 30 segundos (anelamento) e 72⁰C por 30 segundos (extensão), finalizando com um passo final de extensão de sete minutos a 72⁰C. Os produtos de PCR foram confirmados por gel de poli-acrilamida 8% e agarose 1%.

3.15 CONSTRUÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE PARA ENSAIOS FUNCIONAIS DO GENE *ANAPC13*

3.15.1 Clonagem

Para a construção de sequências senso e anti-senso do gene *ANAPC13*, foi utilizado o plasmídeo pcDNA™3.1/myc-HisA (Invitrogen®) (Figura 8). Para ambas as construções, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de reconhecimento para a enzima de restrição *Xba* I (NEB®) (Quadro 6), presente no sítio múltiplo de clonagem do vetor utilizado. As reações de amplificação foram realizadas a 94°C por três minutos, seguidos de 35 ciclos térmicos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com um passo final de extensão de sete minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram tratados com o *PCR purification kit* (Qiagen®) e na sequência digeridos com enzimas de restrição.

Para a sequência senso, após a amplificação com os oligonucleotídeos específicos e confirmação por sequenciamento, foi realizada a digestão do fragmento com a enzima *Xba*I (NEB®) seguida por fosforilação com *T4 nucleotide kinase* (NEB®). Uma alíquota de 10µg do vetor pcDNA™3.1/myc-HisA foi digerida com as enzimas *Xba*I (NEB®) e *EcoRV* (NEB®) e depois desfosforilada com *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (USB®), para evitar religação do vetor. Para a sequência anti-senso, após a amplificação com os oligonucleotídeos específicos e confirmação por sequenciamento, os fragmentos de interesse foram também fosforilados com

T4 *nucleotide kinase* (NEB®). Uma alíquota de 10µg do vetor pcDNA™3.1/myc-HisA foi digerida com *EcoRV* (NEB®) e desfosforilada com SAP.

Alíquotas de vetor e insertos digeridos foram analisadas em gel de agarose 1%, corado com *Syber safe DNA gel stain* (Invitrogen®). Vetor e insertos digeridos foram novamente purificados com o *PCR purification kit* (Qiagen®).

Para as reações de ligação, foram utilizadas 50 ng do vetor e 15 ng dos insertos digeridos, 1X tampão e 1U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®) totalizando um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 16°C durante 12 horas.

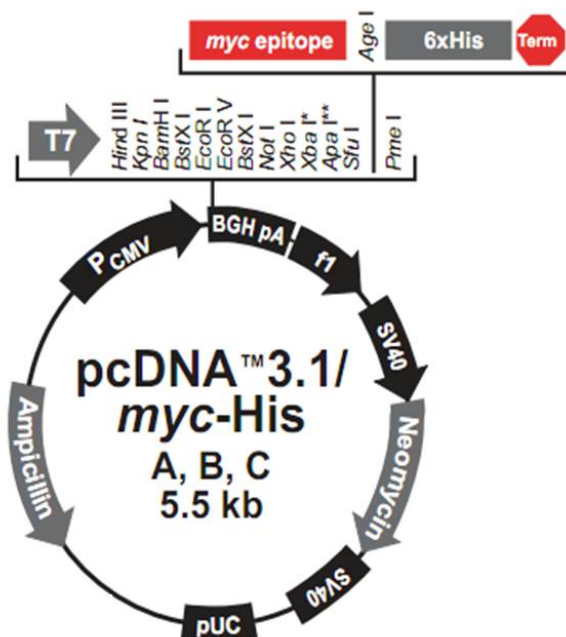


Figura 8 - Plasmídeo pcDNA™3.1/myc-His A.

Quadro 6 - Oligonucleotídeos iniciadores para a construção das sequências senso e anti-senso do gene *ANAPC13*.

Sequências	Oligonucleotídeo iniciador <i>forward- 5'-3'</i>	Oligonucleotídeo iniciador <i>reverso-5'-3'</i>
Senso	TTCTCGAGACCACCATGGACAGT GAGGTTC	TTTCTAGAGTTTCCAATGGGGG
Anti-senso	TTCTCGAGTCAGTTTCCAATGGGG	TTTCTAGAATGGACAGTGAGGTTC
T7/ BGH*	ATTAATACGACTCACTATAGG	CTAGAAGGCACAGTCGAG

*Oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região do sítio múltiplo de clonagem do vetor pcDNA™3.1/myc-His A.

3.15.2 Transformação

Um total de 2 µl da reação de ligação foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* DH10B através do sistema de eletroporação. Imediatamente após a eletroporação, foram acrescentados 1000 µL de meio LB à alíquota e as células transformadas foram recuperadas por 1h a 37°C sob baixa rotação (80 rpm) em agitador orbital. Volumes de 150 µL da transformação foram semeados em placas de meio LB sólido (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%) contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante aproximadamente 18 horas até o aparecimento de colônias.

3.15.3 PCR de colônia e extração plasmidial

A seleção dos clones foi feita por PCR de colônia, utilizando concentração final de 2mM de MgCl₂ a 94°C por três minutos, seguidos de 40 ciclos térmicos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com um passo final de extensão de sete minutos a 72°C. As reações foram visualizadas em gel de agarose 1%,

corado com *Syber Safe DNA gel stain* (Invitrogen®). Os clones escolhidos foram sequenciados pelo sistema de Sanger. Os clones contendo os plasmídeos com insertos de interesse foram submetidos à extração plasmidial, através do *Midiprep kit* (Qiagen®), segundo recomendações do fabricante, e novamente sequenciados pelo sistema de Sanger. Uma representação esquemática das construções senso e anti-senso pode ser visualizada na Figura 9.

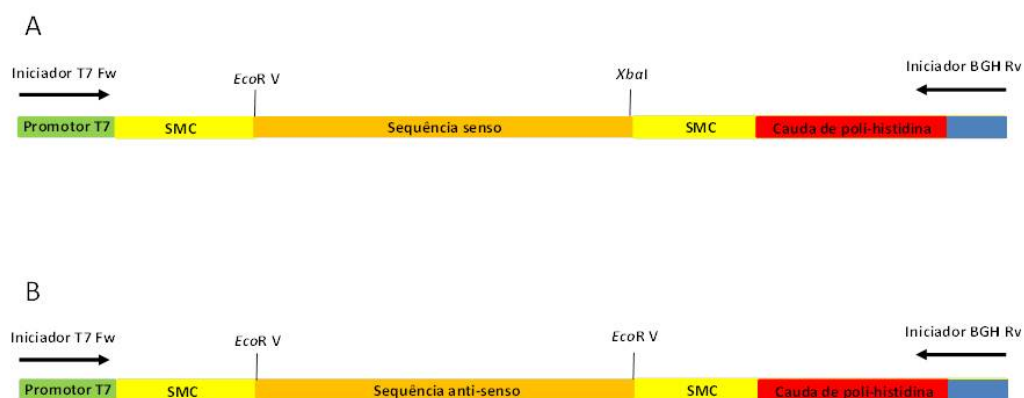


Figura 9 - Construções para ensaios funcionais. A, construção com sequências senso do gene *ANAPC13*. B, construção com sequências anti-senso do gene *ANAPC13*. Estão representados: sítio promotor T7 presente no plasmídeo pcDNATM3.1/myc-HisA (em verde); SMC, sítio múltiplo de clonagem (em amarelo); sequências senso e anti-senso do gene *ANAPC13* (em laranja); cauda de poli histidina (em vermelho); e sítio BGH presente no plasmídeo pcDNATM3.1/myc-HisA (em azul).

3.16 WESTERN BLOT

Extratos celulares totais foram preparados utilizando-se tampão de lise Ripa: Tris-HCl 50mM (pH 8,0), NaCl 150mM, NP40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e cocktail inibidor de protease (1X) (Roche). Após 30

minutos no gelo, a fração solúvel foi coletada por centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A concentração protéica dos extratos foi determinada através do reagente *Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate* (Biorad®) em leitor de ELISA em comprimento de onda de 595 nm. Uma mesma quantidade de proteína (50 µg) para cada amostra foi fervida em tampão de amostra reduzido contendo Tris-HCl 62 mM (pH 8,8), SDS 0,2%, β-mercaptoetanol 50 mM, azul de bromofenol 0,005% e glicerol 10%. As proteínas foram separadas em gel reduzido de poliacrilamida 15% (SDS-Page) em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,3, e SDS 0,1%). Após 1,5 horas de corrida a 30 mA constantes, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF em tampão de transferência (metanol 20%, Tris base 25 mM e glicina 192 mM) por 12 a 18 horas a 30V. A membrana foi então corada com Ponceau S por 10 minutos, para verificação da transferência das proteínas e bloqueada a TA durante 1 hora com 5% de leite em pó desnatado em TBS 1X (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 e NaCl 125 mM), para exposição aos anticorpos primário específicos: Anti-ANAPC13 (policlonal produzido em coelho, 1:500, Life Span Biosciences®) e anti-CLTCL1 (monoclonal, clone 2Q2166, produzido em camundongo, 1:150, Abcam®) por 12 horas a 4°C. Após esta etapa, a membrana foi lavada por 3 vezes em TBS contendo 0,05% do detergente Tween 20 (TBS-Tween) e incubada com os anticorpos secundários específicos, conjugados com peroxidase: anti-igG de camundongo (produzido em ovelhas, 1:1500, Amersham Biosciences®); ou anti-igG de coelho (produzido em burro, 1:2000, Amersham Biosciences®). A incubação foi realizada por 45 minutos

a TA. Após três lavagens com TBS-Tween, por 10 minutos cada, as proteínas foram detectadas com kit de detecção de quimioluminescência *luminata Forte Western HRP Substrate* (Millipore®). A membrana foi exposta e revelada em filme para autoradiograma com *Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences®).

Para validação da transfecção com sequências senso e anti-senso do *ANAPC13*, a expressão da proteína GAPDH foi utilizada como controle positivo, na mesma membrana utilizada para a detecção de *ANAPC13*, e exposta ao anticorpo primário: anti GAPDH (policlonal, produzido em camundongo, 1:1000, Invitrogen®) por 12 horas a 4°C. O restante do ensaio foi realizado como descrito anteriormente.

3.17 TRANSFEÇÃO COM LIPOSSOMOS

A transfecção dos plasmídeos de expressão, contendo sequências senso e anti-senso do gene *ANAPC13*, foi feita na linhagem MCF-7 com *Lipofectamine 2000* (Invitrogen®). Um dia antes da transfecção, as células foram plaqueadas em placas de 100 mm de modo que atingissem 90-95% de confluência no dia do experimento. Para cada transfecção, 24 µg de DNA plasmideal foram diluídos em 1,5 mL de meio OptiMem (Invitrogen®) sem SFB e em tubo separado, 30 µL de lipofectamine 2000 também foram diluídos em 1,5 mL de OptiMem sem SFB. Após 5 minutos de incubação, as soluções contendo DNA e lipofectamina foram misturadas, homogenizadas cuidadosamente e incubadas por 20 minutos a TA. Todo o volume da

solução contendo plasmídeo de expressão e lipofectamina foi adicionado lentamente a cada placa, contendo 15 mL de meio completo. Após 24 horas, foi realizado um repique sendo que as células foram divididas em duas placas de cultura de 100 mm e cultivadas em meio completo na presença de 500 µg/µl do antibiótico G418 para garantir a seleção de clones com transfecção estável. Após um período mínimo de 15 dias de seleção, estoques celulares foram congelados em meio de congelamento, contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 40% de soro fetal bovino e 50% de meio de cultura, e mantidos em nitrogênio líquido. Como controle da transfecção de *ANAPC13* (senso e anti-senso), foi utilizado o vetor de expressão pcDNA3.1/*myc*-His A vazio. O padrão de expressão de *ANAPC13* foi analisado nas linhagens transfectadas tanto por RT-qPCR, como por Western Blot, previamente descritos.

3.18 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR *IN VITRO* EM TEMPO REAL

O ensaio de proliferação celular *in vitro* em tempo real foi realizado com as células não transfectadas (MCF-7), células MCF-7 transfectadas com o vetor pcDNA3.1/*myc*-His A vazio (Mock), células MCF-7 que superexpressam o gene *ANAPC13* (OE-*ANAPC13*) e células MCF-7 que apresentam silenciamento de *ANAPC13* (Sil- *ANAPC13*). Para a análise da proliferação celular *in vitro*, foi utilizado o equipamento RTCA DP (Roche®) e placas E-Plate 16 (Roche®) para medir a proliferação das células em tempo

real. Durante o experimento, o equipamento foi mantido em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Inicialmente, 100 µl de meio completo foram adicionados a cada um dos 16 poços da placa, a qual foi inserida no equipamento para medição do sinal de fundo, segundo as recomendações do fabricante. Após a leitura do sinal de fundo, as células, com confluência entre 75 e 85%, foram plaqueadas (2,5 x 10³ células/poço/100µl de meio McCoy's) em quadruplicata na E-Plate 16 e permaneceram dentro do fluxo a TA por 30 minutos. A medição da proliferação celular foi feita a cada 30 minutos, por um período total de 96 horas, com o auxílio do software RTCA (Roche®). Este ensaio foi realizado pela Dra. Tatiana Iervolino Ricca, do laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Hospital A.C. Camargo.

3.19 ANÁLISE DAS LINHAGENS CELULARES PELA TÉCNICA DE cDNA *MICROARRAY*

Neste estudo, foi utilizada a plataforma de cDNA *microarray* G4851A 8X60K (Agilent®), contendo 60000 oligos de 60 bases de comprimento e que representam todo o genoma humano. As linhagens (MCF-7, Mock, OE-ANAPC13 and Sil-ANAPC13) foram co-hibridizadas com uma referência comum, de modo a permitir comparações horizontais. A co-hibridização foi feita em duplicata através do sistema inverso de incorporação dos corantes Cy3/Cy5 (*Dye/Swap*). A referência comum foi composta por um *pool* de 15 linhagens, descritas no Quadro 7.

Quadro 7 - Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referência.

Linhagens	Descrição da linhagem
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDu	Carcinoma Epidermóide de Faringe
GM 637	Fibroblasto Humano diplóide
H 146	Carcinoma de Pulmão
H 1080	Fibrossarcoma
HB4 α	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Rim embrionário Humano
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-28	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

Os cRNAs fluorescentes foram obtidos pela amplificação linear dos RNAs mensageiros presentes em uma alíquota de 250 ng de RNA total isolado. A amplificação foi feita utilizando um conjunto de reagentes para amplificação e marcação do RNAm amplificado, *Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent®), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante.

Os *oligoarrays* foram hibridados com os alvos fluorescentes durante 17 horas à 65°C em forno de hibridização, utilizando o tampão de hibridação *Hi-RPM* (Agilent®). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas para eliminação de alvos não específicos e de sinal de fundo, segundo recomendações do fabricante.

Os *arrays* foram então digitalizados com o emprego do *Scanner Agilent Bundle* (Agilent®). Os dados de intensidade de cada *spot*, digitalizado no *scanner*, foram extraídos e pré-processados utilizando o programa *Agilent Feature Extraction* versão 10.0 (Agilent®). Nesta etapa, foram extraídos os valores de intensidade de cada *spot* e dos controles de qualidade das hibridações, utilizando RNAs *spike*, adicionados durante a marcação. Foi realizada a normalização utilizando o algoritmo *Lowess*, a fim de eliminar as diferenças de eficiência da emissão de Cy3 e Cy5, assim com a subtração do sinal de fundo local (valor de intensidade ao redor de cada *spot*). O experimento de cDNA *microarray* foi realizado pelo Dr. Alex Fiorini de Carvalho, do nosso grupo de pesquisa.

3.20 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.20.1 Análise dos resultados das reações de RT-qPCR

Para a análise dos dados de RT-qPCR, utilizou-se o programa computacional *GraphPad Prism* (versão 5.0) (GraphPad Software®). Foram adotados os critérios $fold\ change \geq |2|$ e/ou $P < 0,05$ para a determinação dos genes diferencialmente expressos. Foi aplicado o teste T *Student* não pareado para avaliar a significância estatística entre as médias de expressão relativa dos grupos analisados. Para o cálculo do *fold-change*, foram utilizados valores não logados. Para o teste T de Student, os valores de expressão relativa foram logados na base 2.

3.20.2 Análise dos resultados de Imunoistoquímica

Os resultados das reações de imunoistoquímica foram analisados nos programas estatísticos STATA (Intercooled Stata release 7.0) e SPSS 18. O teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado para verificar a associação entre as variáveis categóricas. O teste exato de *Fisher* foi adotado quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5. As sobrevidas global e livre de doença foram calculadas empregando o método de Kaplan-Meier, utilizando o teste de Log-rank, para a comparação entre as curvas de sobrevida. A sobrevida global foi definida como o intervalo entre o início do tratamento (data da cirurgia) e a data da morte, em decorrência do câncer de mama ou em consequência direta do tratamento, e os pacientes vivos contribuíram com a última data presente nos prontuários médicos. O intervalo livre de doença foi mensurado a partir da data do início do tratamento até a data em que recidiva loco regional ou metástase à distância foi diagnosticada. A análise multivariada foi feita por meio de regressão de Cox (*Cox proportional hazards model*), em intervalos de confiança de 95%. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

3.20.3 Análise dos resultados de aCGH

Os dados das imagens dos microarrays foram extraídos com a utilização do *software* Feature Extraction (Agilent Technologies®), e análise para identificação de alterações no número de cópias de segmentos de DNA foi feita utilizando o *software* Nexus 5.1

(Biodiscovery®). A identificação de segmentos com números de cópias aberrantes foi baseada no algoritmo FASST2 com os parâmetros: razão do $\log_2 > 0,2$ e $>1,14$ para ganhos ou ganhos em alto número de cópias, respectivamente, e $< -0,23$ e $<-1,14$ para perdas ou perdas em homozigose, respectivamente. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 10^{-7}$. No mínimo três sondas consecutivas foram consideradas para cada segmento e alterações $< 150\text{Kb}$ foram descartadas.

3.20.4 Análise dos resultados de cDNA *microarray*

As análises dos dados de cDNA *microarray* foram feitas empregando o software *Genespring Agilent* versão 11.0 (Agilent®). Inicialmente as sondas são filtradas com base nos seus valores de intensidade de sinal. Isto permite a remoção daquelas sondas que apresentem valores de sinal muito baixos ou daquelas que tenham atingido saturação. Em seguida, são retiradas as sondas não uniformes ou marginais (M). Em nossa análise, só foram analisadas as sondas que passaram por todos estes critérios.

O perfil de expressão dos genes avaliados foi verificado através do programa *Short Time-series Expression Miner* (STEM). O mesmo programa foi utilizado para verificar a super-representação de processos biológicos, com base no banco de dados do *Gene Ontology* (GO), sendo tal super-representação estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DE CANDIDATOS A MARCADORES MOLECULARES PARA PROGRESSÃO DE CARCINOMA DUCTAL DE MAMA

4.1.1 Avaliação da expressão gênica em células epiteliais tumorais de DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-IDC

A partir de um grupo de 147 genes, previamente identificados por cDNA *microarray* como diferencialmente expressos entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC (CASTRO et al. 2008), foram selecionados 61 candidatos (55 com maior expressão em DCIS puro e seis com maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC) para a validação por RT-qPCR (Anexo 2). A escolha dos genes foi determinada pela disponibilidade de sondas *taqman* para a realização do ensaio TLDA e de anticorpos comerciais para futura validação por IHQ. Além disso, foram escolhidos genes que apresentavam maiores valores de diferença de expressão (*fold change*) no experimento de cDNA *microarray* entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC (CASTRO et al. 2008). Os genes selecionados foram avaliados por RT-qPCR em nove amostras de DCIS puro e em 17 amostras de componente *in situ* do DCIS-IDC (Quadro 2). Entre as amostras escolhidas, cinco DCIS puro e sete componente *in situ* do DCIS-IDC são comuns às amostras utilizadas no experimento de cDNA

microarray (CASTRO et al. 2008), o que caracteriza uma validação biológica parcialmente independente. As amostras foram microdissecadas a laser para a captura das células epiteliais tumorais de DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-IDC (Figura 10). O RNA foi amplificado e posteriormente utilizado para a síntese de cDNA (itens 3.2 e 3.4). Segundo um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, amostras submetidas à amplificação são capazes de gerar informações sobre expressão relativa, utilizando RT-qPCR, com a mesma confiabilidade de amostras não amplificadas (FERREIRA et al. 2010a).

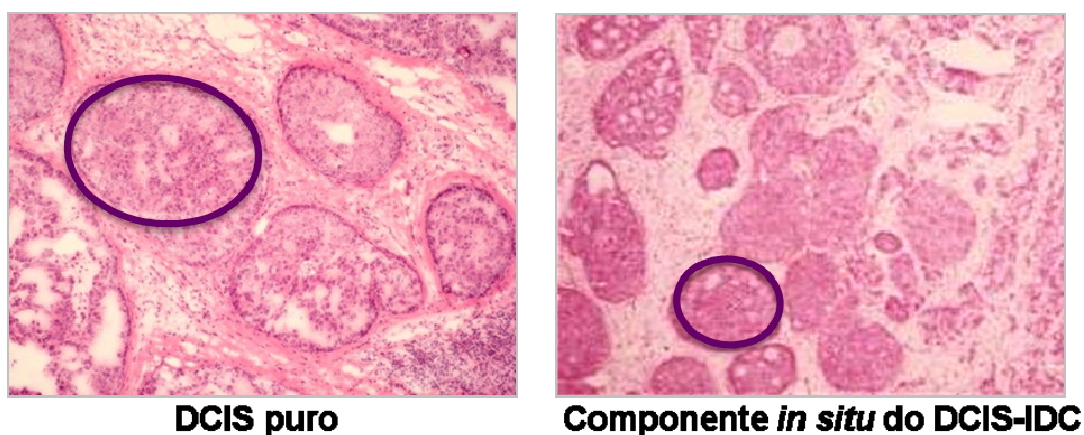


Figura 10 - Representação das lesões ductais pré-invasivas DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC. Genes diferencialmente expressos entre estas duas lesões de morfologia similar, porém com distinto potencial maligno são candidatos a marcadores de predição de invasão em DCIS. Os círculos na figura representam as áreas microdissecadas a laser para captura das células epiteliais dos ductos das duas lesões. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo.

Para o cálculo de expressão relativa, foi utilizado o normalizador *HPRT1*, mais estável segundo a ferramenta geNorm, descrita no item 3.6.3.

Considerando o critério de *fold change* $\geq|2|$, 31 genes apresentaram concordância de expressão com o experimento de cDNA *microarray*, sendo 18 deles com significância estatística ($P<0,05$) (Tabela 2). Ainda, um dos genes analisados (*TRAP1*) apresentou *fold change* de 1,5, porém estatisticamente significativo ($P=0,04$), com maior expressão no grupo DCIS puro em relação ao componente *in situ* do DCIS-IDC, concordando com os dados de cDNA *microarray* (Tabela 2). Os gráficos de expressão podem ser visualizados na Figura 11.

Na sequência, os 61 genes foram novamente avaliados considerando apenas as amostras DCIS puro e componente *in situ* do DCIS-IDC com mesmo grau nuclear. Como todas as amostras DCIS puro desta análise apresentam grau nuclear 3 (Quadro 2), foram avaliadas apenas as amostras componente *in situ* do DCIS-IDC com este mesmo grau. Considerando o critério de *fold change* $\geq|2|$, 29 genes apresentaram concordância com os dados de cDNA *microarray*, sendo 10 com significância estatística ($P<0,05$) (Tabela 2). Em relação à análise anterior, quatro genes que haviam sido considerados validados (*DENND3*, *IFT57*, *P4HB* e *SULF1*) não atingiram o critério de *fold change* $\geq|2|$. Por outro lado, os genes *IMMT* e *KIAA0664* atingiram este critério na análise apenas com amostras de mesmo grau nuclear. Os dados completos, referentes aos 61 genes avaliados estão descritos no Anexo 2. Os gráficos de expressão dos genes validados, considerando amostras de mesmo grau nuclear, podem ser visualizados no Anexo 3.

Tabela 2 - Resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e componente *in situ* do DCIS-IDC avaliados por RT-qPCR, utilizando o sistema *Taqman*.

Genes ¹	cDNA Microarray* (fold change e P<0,01)	RT-qPCR (fold change)		RT-qPCR (fold change)	
		Considerando todas as amostras	P	Considerando amostras de mesmo grau nuclear	P
ALSM1	3,8	6,34	0,003	8,87	0,007
ANAPC13	2,19	3,00	0,013	2,45	0,08
ARHGAP9	2,92	10,17	0,0013	8,43	0,01
ARHGAP19	2,2	11,95	0,03	28,23	0,05
AZGP1	2,94	4,29	0,01	7,54	0,005
CAMP	2,84	3,08	0,03	2,23	0,11
CHRNA1	5,11	3,08	0,01	4,16	0,44
CLTCL1	2,07	4,93	0,03	3,14	0,13
CPNE3	2,38	2,83	0,02	2,52	0,10
CTTNBP2NL	4,84	4,78	0,009	5,88	0,01
DENND3	3,51	2,12	0,39	1,77	0,78
DHX35	3,07	5,95	0,09	5,55	0,19
EPOR	2,99	10,51	0,01	13,13	0,03
FCN1	3,79	2,8	0,46	2,80	0,46
FN3K	6,3	2,8	0,17	4,60	0,09
HLTF	2,84	2,98	0,001	4,47	0,0005
IFT57	3,3	2,0	0,05	1,71	0,20
IMMT	2,92	1,51	0,30	2,07	0,22
IRF8	4,33	2,62	0,16	2,00	0,40
ITGB2	3,27	2,99	0,1	2,30	0,32
KIAA0664	3,45	1,66	0,77	2,11	0,04
LOX	-2,01	-4,86	0,34	-5,52	0,44
LPXN	3,2	2,47	0,29	2,08	0,91
LSM4	2,85	3,53	0,003	2,93	0,02
P4HB	3,01	2,13	0,03	1,82	0,07
PEPD	3,65	2,12	0,11	2,04	0,13
RABEPK	4,94	2,17	0,03	2,21	0,05
RARRES3	3,64	3,38	0,01	2,85	0,07
REC8	3,37	9,5	0,008	5,82	0,03
SAMD4A	4,11	7,8	0,08	6,25	0,08
SULF1	-3,92	-2,0	0,14	-1,62	0,11
TARDBP	4,03	6,02	0,32	7,24	0,32
TRAP1	3,5	1,5	0,04	1,25	0,10
UTP20	3,16	2,76	0,001	2,86	0,003

Valores positivos indicam maior expressão em DCIS puro, enquanto que valores negativos demonstram maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ* puro; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. (1) São apresentados apenas os genes concordantes com o experimento de cDNA *microarray*. (*) CASTRO et al. 2008.

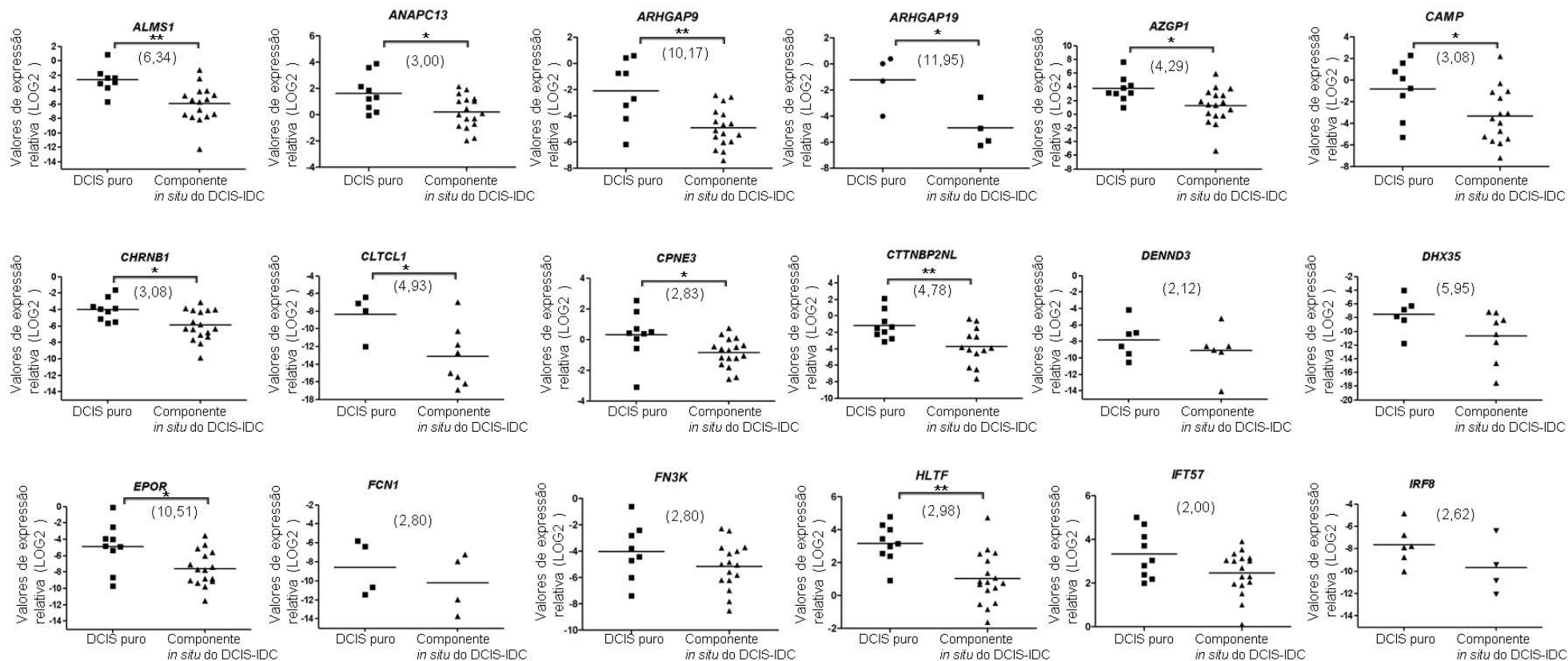


Figura 11- Gráfico dos genes validados por RT-qPCR através do sistema *Taqman*, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray*.

Cont/Figura11

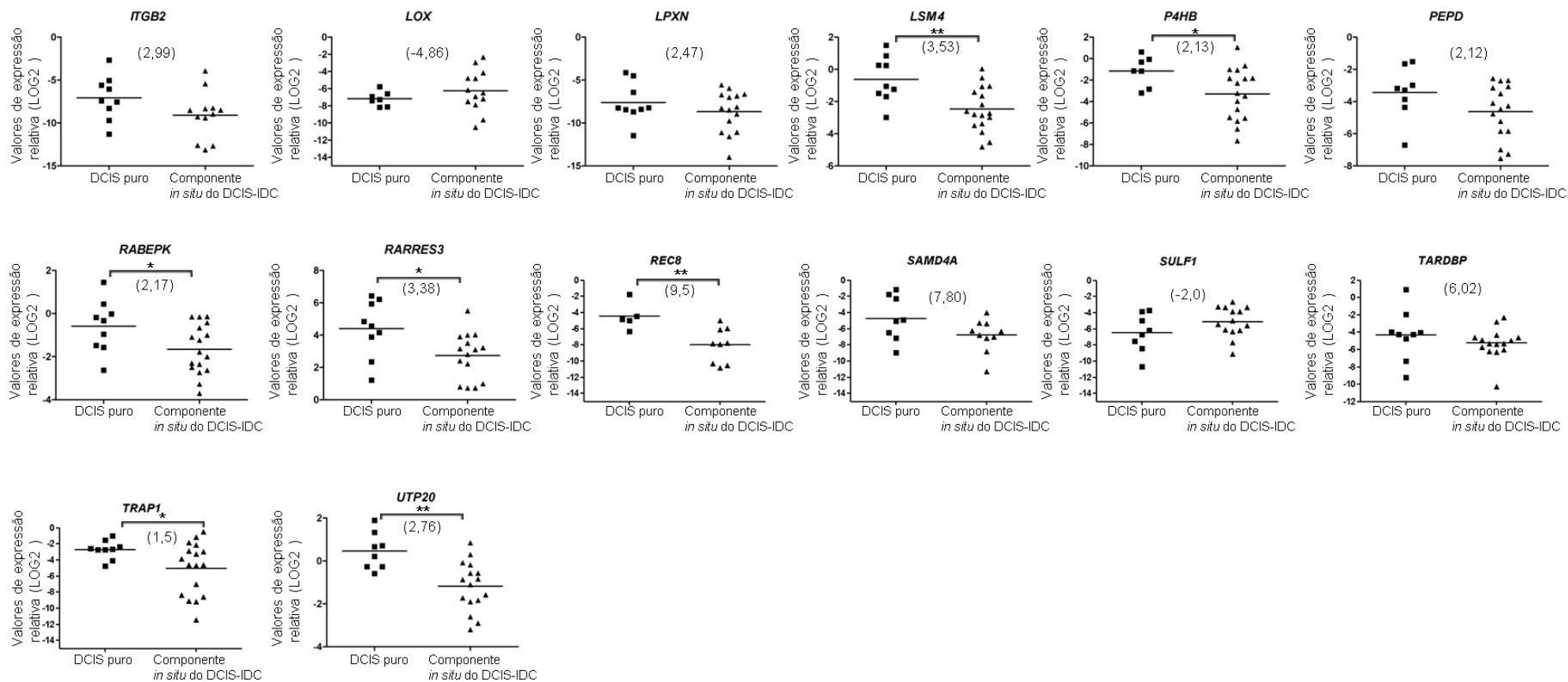


Figura 11 - Gráfico dos genes validados por RT-qPCR através do sistema *Taqman*, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray*. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

Outra análise de validação por RT-qPCR foi realizada em oito dos 61 genes selecionados (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19*, *CLTCL1*, *CPNE3*, *IMMT*, *NGDN* e *PIAS2*), utilizando o sistema *SYBR green*. Estes genes foram avaliados em cinco amostras de DCIS puro e em 15 amostras componente *in situ* do DCIS-IDC (Quadro 2). Nesta análise, todas as amostras DCIS puro e nove das 15 amostras do componente *in situ* do DCIS-IDC foram comuns às utilizadas no experimento de cDNA *microarray*. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC avaliados por RT-qPCR, utilizando o sistema *SYBR Green*.

Gene	cDNA <i>Microarray</i> * (<i>fold change</i> e $P < 0,01$)	RT-qPCR (<i>fold change</i>)
<i>ADFP</i>	2,79	6,22 ^a
<i>ANAPC13</i>	2,19	2,00 ^a
<i>ARHGAP19</i>	2,20	6,88 ^a
<i>CLTCL1</i>	2,07	6,25 ^a
<i>CPNE3</i>	2,38	-1,15
<i>IMMT</i>	2,92	1,76
<i>NGDN</i>	2,52	-1,12
<i>PIAS2</i>	2,43	-1,44

Valores positivos indicam maior expressão em DCIS puro, enquanto que valores negativos demonstram maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC. ^aGenes com expressão de RNAm confirmada em ambas as metodologias. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ* puro; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. (*) CASTRO et al. (2008).

Para a análise de RT-qPCR, utilizando o sistema *SYBR green*, *HPRT1* e *RPLP0* foram os normalizadores considerados mais estáveis segundo a ferramenta geNorm, descrita no item 3.6.3. Considerando o limiar de diferença de expressão (*fold change*) $\geq |2|$, quatro genes apresentaram resultados concordantes com a técnica de *cDNA microarray* (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19* e *CLTCL1*), com maior expressão no grupo DCIS puro quando comparado ao componente *in situ* do DCIS-IDC. Os gráficos de expressão podem ser visualizados na Figura 12.

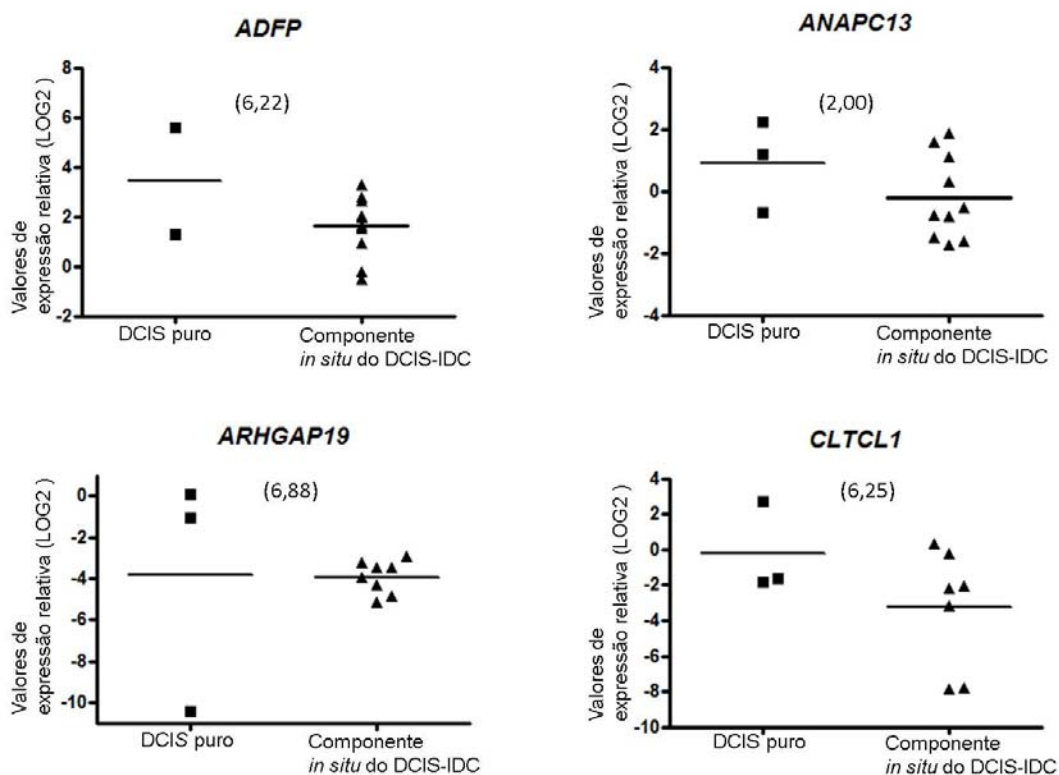


Figura 12 - Gráfico dos genes avaliados por RT-qPCR através do sistema *SYBR green*, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de *cDNA microarray*. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo.

De forma geral, foi observada grande semelhança entre os dois sistemas de análises de RT-qPCR (*Taqman* e *SYBR green*). Porém, devido ao fato destes dois sistemas apresentarem sensibilidades e especificidades distintas e do conjunto de amostras ter variado entre as duas análises, foram também observadas pequenas diferenças para dois genes: *ADFP* não foi considerado diferencialmente expresso na análise com o sistema *Taqman*, porém apresentou maior expressão em DCIS puro na análise por *SYBR green*; e *CPNE3* que foi observado mais expresso em DCIS puro em relação ao componente *in situ* do DCIS-IDC na análise por *Taqman*, porém não apresentou diferença de expressão entre os dois grupos na análise por *SYBR green*.

Os 33 genes com expressão concordante com os dados de cDNA *microarray* (CASTRO et al. 2008), pelos dois sistemas de RT-qPCR utilizados, foram avaliados ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama, incluindo amostras não neoplásicas (bordas de fibroadenoma) e amostras somente de carcinoma ductal invasivo (IDC). Os gráficos de expressão, ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama, podem ser visualizados no Anexo 4.

4.1.2 Seleção de candidatos para avaliação por imunoistoquímica (IHQ)

Para avaliação por IHQ, foram inicialmente escolhidos seis genes, quatro (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19* e *CLTCL1*) com maior expressão no DCIS puro e dois (*LOX* e *SULF1*) com maior expressão no componente *in*

situ do DCIS-IDC. Uma breve descrição dos genes escolhidos para avaliação por IHQ está no Quadro 8.

Quadro 8 - Descrição dos genes com dados de expressão concordantes entre RT-qPCR e cDNA *microarray*, escolhidos para a avaliação por IHQ.

Gene	Função
ADFP	<i>ADFP (adipose differentiation-related protein)</i> codifica proteínas relacionadas com a diferenciação de adipócitos. Um aumento nos níveis de RNAm de ADFP é um dos primeiros sinais de diferenciação de adipócitos.
ANAPC13	<i>ANAPC13 (anaphase-promoting complex subunit 13)</i> é uma das treze subunidades do complexo promotor de anáfase (APC/C), o qual está diretamente relacionado com a separação de cromátides irmãs durante a transição metáfase-anáfase.
ARHGAP19	<i>ARHGAP19 (Rho GTPase activating protein 19)</i> codifica reguladores das Rho GTPases, as quais estão envolvidas em migração celular, proliferação e diferenciação, além de remodelamento da actina e progressão para o estágio G1 do ciclo celular.
CLTCL1	<i>CLTCL1 (clathrin, heavy chain-like 1)</i> é um membro da família das clatrininas de cadeia pesadas, a qual desempenha um importante papel no processo de processo de tráfego intracelular e na estabilização de fibras de fuso mitótico.
LOX	A proteína codificada pelo gene <i>LOX</i> (Lysyl oxidase) é uma enzima de matrix extracelular, dependente de zinco, que catalisa ligações cruzadas entre colágenos e elastina, processo essencial para a estabilidade das fibras de colágeno e para a elasticidade e integridade da elastina madura.
SULF1	<i>SULF1, (Sulfatase 1)</i> codifica a enzima de matrix extracelular, Heparan sulfate 6-O-endo-sulfatases, que remove grupos sulfato-6-O de proteoglicanos heparanos de sulfato (HSPGs), alterando o sítio de ligação de moléculas envolvidas com sinalização celular e afetando processos como o crescimento celular, diferenciação, proliferação, migração e invasão.

4.1.3 Avaliação da expressão proteica em lesões DCIS puras e no componente *in situ* do DCIS-IDC

As proteínas codificadas pelos genes selecionados para análise por IHQ (ADFP, ANAPC13, ARHGAP19, CLTCL1, LOX e SULF1) foram avaliadas em um TMA composto por 77 amostras independentes de DCIS [(41 amostras de DCIS puro e 36 amostras componente *in situ* do DCIS-IDC (item 3.7.1)]. As amostras foram avaliadas em duplicatas. Para esta análise, as amostras foram categorizadas como negativas (marcação ausente ou fraca) e positivas (marcação moderada ou forte), conforme descrito no item 3.7.3. ADFP, CLTCL1, LOX e SULF1 apresentaram um padrão de marcação de marcação predominantemente citoplasmático enquanto que ANAPC13 e ARHGAP19 apresentaram tanto padrão de marcação nuclear quanto citoplasmático. Os resultados, referentes à distribuição da marcação imunohistoquímica dos marcadores avaliados nos tipos histológicos de DCIS (DCIS puro e componente *in situ* do DCIS-IDC), podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Expressão de ADFP, ANAPC13, ARHGAP19, CLTCL1, LOX e SULF1 em um TMA composto por lesões DCIS puro e componente *in situ* do DCIS-IDC.

Proteína	Tipos histológicos de DCIS	Análise IHQ, n (%) ¹			Proteína	Tipos histológicos de DCIS	Análise IHQ, n (%) ¹		
		Negativo,	Positivo	P			Negativo	Positivo	P
ADFP (citoplasma)	DCIS puro	26 (68,40)	12 (31,60)	0,79	ARHGAP19 (citoplasma)	DCIS puro	11 (31,40)	24 (68,60)	0,8
	Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	22 (73,30)	8 (26,70)			Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	8 (28,60)	20 (71,40)	
ANAPC13 (núcleo)	DCIS puro	13 (35,10)	24 (64,90)	0,78	CLTCL1 (citoplasma)	DCIS puro	14 (40,00)	21 (60,00)	0,0
	Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	10 (38,40)	16 (61,60)			Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	20 (64,50)	11 (35,50)	
ANAPC13 (citoplasma)	DCIS puro	11 (30,50)	25 (69,50)	0,02*	LOX (citoplasma)	DCIS puro	26 (76,00)	8 (24,00)	0,3
	Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	16 (59,20)	11 (40,80)			Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	18 (67,00)	9 (33,00)	
ARHGAP19 (núcleo)	DCIS puro	25 (71,40)	10 (28,60)	0,08	SULF1 (citoplasma)	DCIS puro	23 (77,00)	7 (33,00)	0,00
	Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	14 (50,00)	14 (50,00)			Componente <i>in situ</i> do DCIS-IDC	12 (40,00)	18 (60,00)	

Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. ⁽¹⁾ Percentual considerando número de casos avaliáveis; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

Foi observada maior expressão citoplasmática de ANAPC13 e CLTCL1 ($P=0,02$, e $P=0,04$ respectivamente) em lesões DCIS puro e maior expressão citoplasmática de SULF1 no componente *in situ* do DCIS-IDC ($P=0,004$), concordando com os resultados obtidos nas análises de RNAm. Para as demais proteínas analisadas [ADFP, ANAPC13 (nuclear), ARHGAP19 e LOX], não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre estas duas lesões pré-invasivas.

Com base nestes resultados, foi avaliada a associação da marcação citoplasmática de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 (Tabela 5) com variáveis clinicopatológicas disponíveis para as amostras analisadas.

Tabela 5 - Associação entre expressão de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 e características clinicopatológicas em um TMA composto por lesões *in situ*.

Variável	Categoria	ANAPC13, n (%) ¹			CLTCL1, n (%) ¹			SULF1, n (%) ¹		
		Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P
Subtipo histológico	Não comedo	21 (41,20)	30 (58,80)	0,42	29 (54,70)	24 (45,30)	0,09	30 (64,00)	17 (36,00)	0,07
	Comedo	6 (54,60)	5 (45,40)		3 (27,30)	8 (72,70)		1 (17,00)	5 (83,00)	
Grau nuclear	Não Alto grau	14 (41,20)	20 (58,80)	0,49	19 (57,60)	14 (42,40)	0,26	14 (56,00)	11 (44,00)	0,72
	Alto grau	13 (50,00)	13 (50,00)		13 (43,30)	17 (56,70)		17 (61,00)	11 (39,00)	
Grau histológico	Não Alto grau	12 (38,70)	19 (61,30)	0,32	18 (60,00)	12 (40,00)	0,19	14 (56,00)	11 (44,00)	0,81
	Alto grau	13 (52,00)	12 (48,00)		12 (42,90)	16 (57,10)		16 (59,00)	11 (41,00)	
Receptor de estrógeno	Negativo	12 (75,00)	4 (25,00)	<0,01**	11 (57,90)	8 (42,10)	0,46	10 (56,00)	8 (44,00)	0,88
	Positivo	12 (30,80)	27 (69,20)		19 (47,50)	21 (52,50)		19 (58,00)	14 (42,00)	
Receptor de progesterona	Negativo	18 (62,10)	11 (37,90)	<0,01**	16 (50,00)	16 (50,00)	0,88	15 (60,00)	10 (40,00)	0,86
	Positivo	6 (23,10)	20 (76,90)		13 (48,20)	14 (51,80)		15 (58,00)	11 (42,00)	
Status de HER2	Negativo	4 (57,00)	3 (43,00)	0,68	5 (62,50)	3 (37,50)	0,46	3 (37,00)	5 (63,00)	0,24
	Positivo	21 (44,00)	27 (56,00)		22 (47,00)	25 (53,00)		28 (64,00)	16 (36,00)	

Abreviações: HER2, *Human epidermal growth factor receptor type 2*⁽¹⁾ Percentual considerando número de casos com informação completa; (**)*P*<0.01.

Para ANAPC13, foi observada associação estatisticamente significativa entre presença de marcação citoplasmática e *status* positivo para os receptores ER e PR ($P < 0,01$). Para CLTCL1 e SULF1, não foram encontradas associações com significância estatística.

Para melhor caracterizar a marcação e sublocalização celular das proteínas ANAPC13, CLTCL1 e SULF1, foi realizada uma análise mais detalhada e refinada da marcação imunoistoquímica em cortes inteiros de 10 casos (cinco DCIS puro e cinco DCIS-IDC), utilizando um *scanner* digital de lâminas, Scanscope XT (Aperio®) (Figura 13). Para ANAPC13, a localização da marcação imunoistoquímica é nuclear e citoplasmática e nenhuma marcação de membrana foi observada. Para CLTCL1, a marcação é predominantemente citoplasmática, com fraca marcação de membrana. Para SULF1, a marcação também é predominantemente citoplasmática. Nenhuma marcação estromal foi verificada para os três anticorpos analisados. Para ANAPC13 e CLTCL1, foi verificada a especificidade dos anticorpos pela técnica de Western Blot (Figura 13).

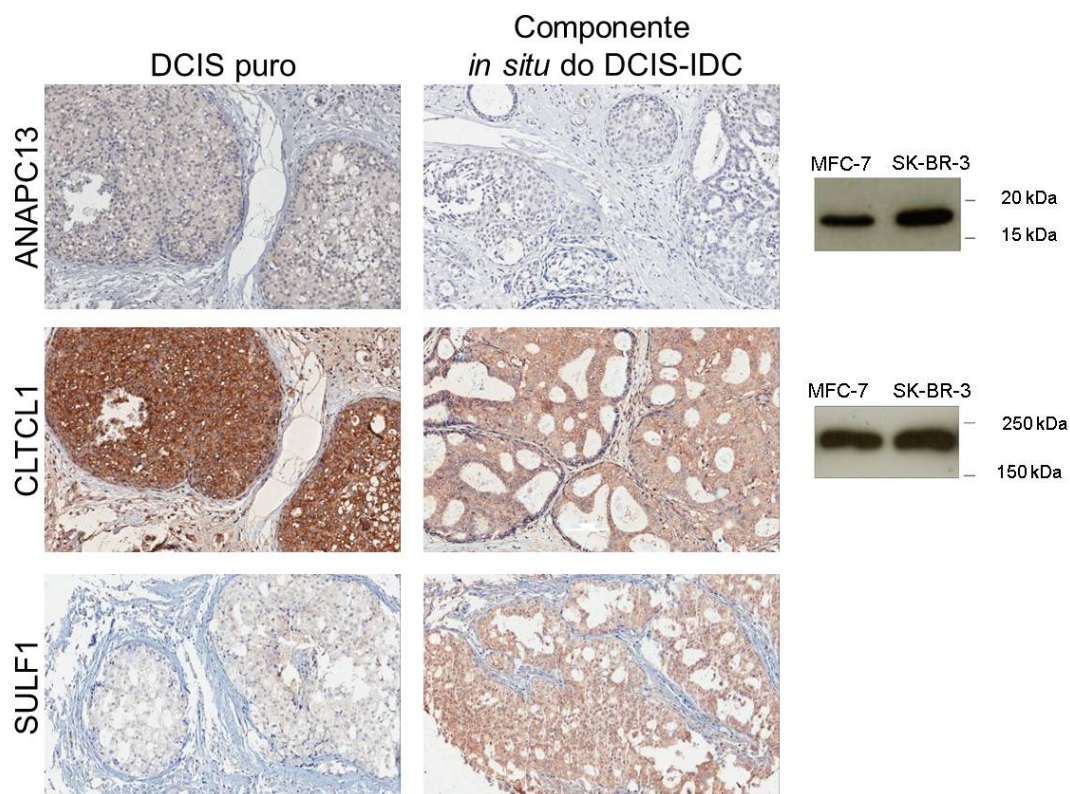


Figura 13 - Expressão proteica de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 em DCIS puro e no componente *in situ* do DCIS-IDC. Para ANAPC13 e CLTCL1, maior expressão é observada em lesões DCIS puro, enquanto para SULF1, maior expressão é vista no componente *in situ* do DCIS-IDC. A especificidade dos anticorpos foi determinada pela técnica de Western Blot para ANAPC13 (19 kDa) e CLTCL1 (192 kDa). SULF1 não foi avaliado pela técnica de Western Blot. Imagens adquiridas do ScanScope XT scanner (Aperio®). Aumento 200X. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; MFC-7 e SK-BR-3, linhagens celulares de câncer de mama.

4.1.4 Avaliação de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 como marcadores candidatos a predição de invasão em DCIS

As proteínas que apresentaram diferenças de expressão proteica entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC (ANAPC13, CLTCL1 e SULF1) foram novamente avaliados por IHQ em um grupo de amostras, inicialmente diagnosticadas como DCIS puro, e que apresentaram ou não

um segundo evento (critério definido no item 3.8), ao longo de pelo menos seis anos de seguimento.

Para uma avaliação preliminar do potencial destes candidatos a predição de invasão em DCIS, foram selecionados 10 casos que apresentaram segundo evento e 25 casos sem segundo evento. As reações de IHQ foram analisadas em cortes inteiros da neoplasia. Para todas as proteínas, foi avaliada apenas a marcação citoplasmática, a qual foi identificada como diferencialmente expressa entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC para os três candidatos. Na leitura das lâminas foi considerada a intensidade de marcação (ausente, fraca, moderada e forte) juntamente com as porcentagens relativas a cada intensidade.

Devido à heterogeneidade de marcação, considerando o corte inteiro da neoplasia, foi necessário adotar diferentes abordagens para a análise dos dados de IHQ: a primeira, considerando a marcação mais intensa (de ausente a forte); a segunda considerando a mais frequente (em porcentagem); e a terceira, considerando tanto a intensidade quanto a porcentagem de marcação, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Esquema para análise de IHQ, obtido pela combinação de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas.

Intensidade	Porcentagem de células marcadas (%)					
	0	1-20	21-40	41-60	61-80	81-100
Fraco	0	2	3	4	5	6
Moderado	0	3	4	5	6	7
Forte	0	4	5	6	7	8

Para as duas primeiras abordagens, as amostras foram categorizadas em negativas (ausência de marcação ou intensidade fraca) e positivas (intensidade moderada ou forte). A exceção foi feita para o CLTCL1, onde a maioria das amostras apresentou marcação moderada e forte, com ausência de amostras classificadas como marcação ausente ou fraca no grupo DCIS com segundo evento. Portanto, para esta proteína, as amostras foram categorizadas em negativas (ausência de marcação ou intensidade fraca ou moderada) e positivas (intensidade forte).

Para a terceira abordagem, as amostras foram categorizadas como: negativas (escores 0-5) e positivas (escores 6-8). Novamente, foi feita exceção para CLTCL1, para o qual as amostras foram categorizadas como negativas (escores 0-6) e positivas (escores 7 e 8). Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 em casos DCIS com diferentes evoluções.

Tipos de análise	Amostras DCIS	ANAPC13, n (%)			CLTCL1, n (%)			SULF1, n (%)		
		Categorização			Categorização			Categorização		
		Negativo	Positivo	<i>P</i>	Negativo	Positivo	<i>P</i>	Negativo	Positivo	<i>P</i>
Considerando maior intensidade de marcação	sem segundo evento	12 (60,00)	8 (40,00)	0,66	10 (50,00)	10 (50,00)	>0,99	13 (65,00)	7 (35,00)	0,42
	com segundo evento	3 (42,90)	4 (57,10)		4 (44,40)	5 (55,60)		4 (44,40)	5 (55,60)	
Considerando maior frequência de marcação	sem segundo evento	13 (65,00)	7 (35,00)	>0,99	14 (70,00)	6 (30,00)	>0,99	15 (75,00)	5 (25,00)	0,39
	com segundo evento	4 (57,10)	3 (42,90)		7 (77,80)	2 (22,20)		5 (55,60)	4 (44,40)	
Considerando frequência e intensidade de marcação	sem segundo evento	7 (35,00)	13 (65,00)	0,18	14 (70,00)	6 (30,00)	0,10	7 (35,00)	13 (65,00)	0,69
	com segundo evento	5 (71,40)	2 (28,60)		3 (33,00)	6 (66,70)		4 (44,40)	5 (55,60)	

Entre os 10 casos DCIS com segundo evento, um foi excluído do estudo por apresentar microinvasão, no corte histológico onde foi realizada a IHQ, a qual não estava presente no corte histológico do diagnóstico inicial, restando nove amostras para análise. Para ANAPC13, outras duas amostras não apresentaram lesão avaliável na análise de IHQ. Entre as 25 amostras DCIS sem segundo evento, duas foram excluídas por não apresentarem lesão avaliável na IHQ e outras três foram eliminadas por apresentarem microinvasão, também não detectada no diagnóstico inicial, restando 20 amostras para a análise.

Como mostrado na Tabela 7, não foram observadas associações estatisticamente significativas em nenhum dos três tipos de análise. Entretanto, para ANAPC13, quando as amostras foram analisadas considerando tanto a frequência quanto à intensidade de marcação, observa-se maior expressão desta proteína em amostras DCIS puro sem segundo evento. Este resultado é esperado, já que ANAPC13 apresenta maior expressão em DCIS puro, lesões de melhor prognóstico em relação ao componente *in situ* do DCIS-IDC, que apresenta o componente invasor associado. Para SULF1, considerando marcação mais intensa ou a marcação mais frequente, observa-se menor expressão da proteína no grupo DCIS sem segundo evento, o que também é esperado já que SULF1 foi encontrado mais expresso no componente *in situ* do DCIS-IDC.

É importante mencionar, mais uma vez, que esta foi apenas uma avaliação preliminar destas três proteínas. Certamente, é necessário um

aumento do número amostral para uma avaliação mais precisa do potencial destes marcadores como preditores de invasão de DCIS.

4.1.5 Expressão proteica ao longo da progressão de carcinoma ductal de mama

Para investigar a expressão das proteínas ao longo da progressão do carcinoma ductal, os marcadores com diferença de expressão proteica entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC (ANAPC13, CLTCL1 e SULF1) foram também avaliados em um segundo TMA, composto por lesões IDC (item 3.7.1). Nesta análise, apenas a marcação citoplasmática foi considerada. Para ANAPC13, 187 amostras foram analisáveis e a ausência de marcação foi observada em 39,0% dos casos IDC, enquanto que a marcação fraca ou moderada foi observada em 40,1% e em 20,9%, respectivamente. Forte marcação citoplasmática não foi observada. Em CLTCL1, 181 amostras foram analisáveis e a ausência de marcação foi vista em 25,2% dos casos, enquanto que marcação fraca, moderada ou forte foi observada em 43,6%, 26,2% e em 5,0%, respectivamente. Para SULF1, 251 amostras foram analisáveis e a ausência de marcação foi observada em 25,5% dos casos, enquanto que marcação fraca, moderada ou forte foi vista em 54,6%, 17,9% e 2,0%, respectivamente.

Para verificar se havia concordância entre os níveis de expressão de RNAm e de proteína ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama, foi contabilizada a frequência de amostras categorizadas como negativas (marcação ausente ou fraca) e positivas (marcação moderada ou

forte) em cada grupo (DCIS puro, componente *in situ* do DCIS-IDC e IDC) na IHQ. Para ANAPC13, observou-se uma redução significativa entre as amostras classificadas como positivas e aumento das amostras categorizadas como negativas nos três grupos (Figura 14, A). Na análise de CLTCL1, verificou-se uma redução significativa na frequência de amostras categorizadas como positivas entre o DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC. Entretanto, frequências similares de amostras positivas para CLTCL1 foram observadas entre o componente *in situ* do DCIS-IDC e o IDC (Figura 14, A). Para SULF1, a frequência de amostras positivas aumenta significativamente entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC, porém há uma queda também significativa de frequência de positividade entre o componente *in situ* do DCIS-IDC e IDC (Figura 14,A). A expressão proteica foi comparada à expressão de RNAm ao longo da progressão do DC (anexo 4) (Figura 14, B).

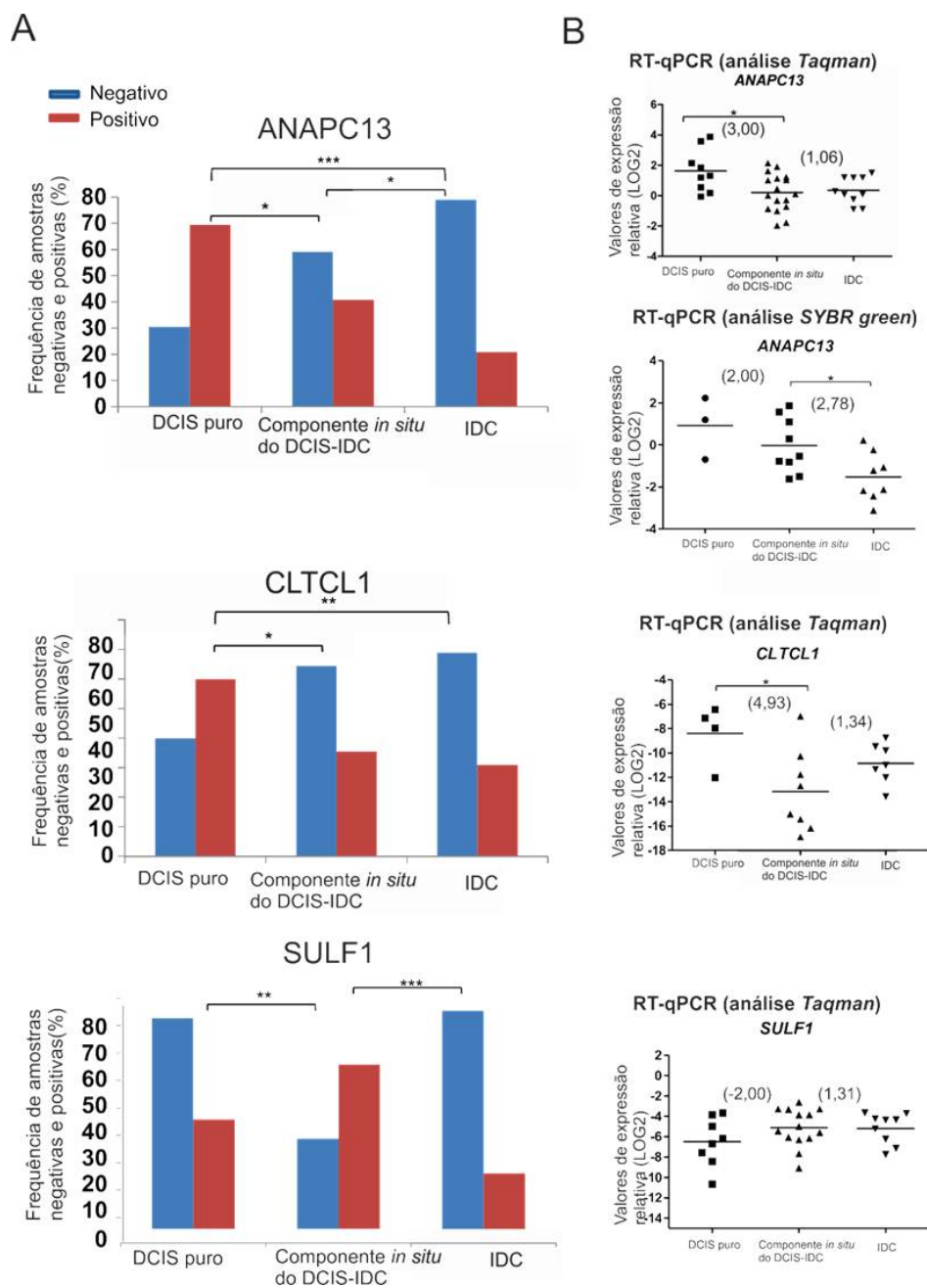


Figura 14 - Expressão de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama. (A), Gráficos de barras representando a frequência de amostras categorizadas na IHQ como negativas (marcação ausente e fraca) e positivas (marcação moderada e forte) em DCIS puro, componente *in situ* do DCIS-IDC e IDC, respectivamente, para ANAPC13, CLTCL1 e SULF1. (B), gráficos de expressão de RNAm, obtidos pela análise de RT-qPCR. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*). Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; IDC, carcinoma ductal invasivo. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$.

Para *ANAPC13*, não há diferença de expressão de RNAm entre o componente *in situ* do DCIS-IDC e o IDC, segundo os dados de RT-qPCR pelo sistema *Taqman*. Porém, uma redução de expressão é verificada entre os dois grupos na análise com *SYBR green* (Fold 2,78, $P=0,02$), o que é coincidente ao padrão observado para a proteína ANAPC13. Para CLTCL1, há correspondência entre a expressão de RNAm e proteína nos três grupos analisados. Para SULF1, também não foi observada diferença de expressão de RNAm entre o componente *in situ* do DCIS e o IDC (*fold change*=1,31). Entretanto, como já mencionado, há uma redução de expressão da proteína estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($P<0,001$).

4.1.6 Avaliação do potencial prognóstico de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1

O potencial prognóstico de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 foi avaliado utilizando o TMA2, composto por amostras IDC (item 3.7.1). Para esta análise, as amostras foram categorizadas como negativas (marcação ausente) e positivas (marcação fraca, moderada e forte) (item 3.7.3), considerando, portanto, mesmo amostras com fraca intensidade de marcação como positivas. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Associação entre expressão citoplasmática de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 e características clinicopatológicas no TMA composto por amostras IDC.

Variável	Categoria	ANAPC13, n (%) ¹			CLTCL1, n (%) ¹			SULF1, n (%) ¹		
		Negativo	Positivo	<i>P</i>	Negativo	Positivo	<i>P</i>	Negativo	Positivo	<i>P</i>
Número de linfonodos comprometidos	≤3	34 (32,00)	72 (68,00)	0,09	30 (28,60)	75 (71,40)	0,08	27 (20,80)	103 (79,20)	0,03*
	>3	23 (46,00)	27 (54,00)		8 (16,00)	42 (84,00)		28 (33,70)	55 (66,30)	
Presença de lesão intraductal	Ausente	40 (50,00)	40 (50,00)	0,24	19 (24,40)	59 (75,60)	0,36	36 (26,90)	98 (73,10)	0,55
	Presente	10 (37,00)	17 (63,00)		9 (33,30)	18 (67,70)		13 (22,80)	44 (77,20)	
Receptor de estrógeno	Negativo	24 (40,70)	35 (59,30)	0,60	14 (23,30)	46 (76,70)	0,83	22 (30,60)	50 (69,40)	0,22
	Positivo	44 (36,70)	76 (63,30)		29 (24,80)	88 (75,20)		36 (23,10)	120 (76,90)	
Receptor de progesterona	Negativo	42 (42,90)	56 (57,10)	0,38	25 (25,00)	75 (75,00)	0,83	39 (32,00)	83 (68,00)	0,01*
	Positivo	28 (36,40)	49 (63,60)		17 (23,60)	55 (76,40)		16 (17,00)	78 (83,00)	
<i>Status</i> de HER2	Negativo	54 (38,00)	88 (62,00)	0,64	35 (25,00)	103 (75,00)	0,89	45 (23,00)	151 (77,00)	0,27
	Positivo	14 (42,00)	19 (58,00)		8 (24,00)	25 (76,00)		13 (31,00)	29 (69,00)	
EGFR	Negativo	53 (38,00)	87 (62,00)	0,90	32 (23,00)	106 (77,00)	0,26	35 (24,00)	111 (76,00)	0,48
	Positivo	11 (37,00)	19 (63,00)		9 (33,00)	18 (67,00)		25 (28,10)	64 (71,90)	

Cont/ Tabela 8

Variável	Categoria	ANAPC13, n (%) ¹		P	CLTCL1, n (%) ¹		P	SULF1, n (%) ¹		P
		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
CK5/6	Negativo	51 (39,00)	79 (61,00)	0,99	27 (22,00)	98 (78,00)	0,06	51 (26,70)	140 (73,30)	0,25
	Positivo	17 (39,00)	27 (61,00)		16 (36,00)	29 (64,00)		9 (18,80)	39 (81,30)	
Grau nuclear	1	1 (50,00)	1 (50,00)	0,96	1 (50,00)	1 (50,00)	0,77	0 (0,00)	4 (100,00)	0,18
	2	19 (44,20)	24 (55,80)		11 (28,20)	28 (71,80)		15 (20,30)	59 (79,70)	
	3	48 (46,20)	56 (53,80)		28 (27,20)	75 (72,80)		47 (28,80)	116 (71,20)	
Grau de SBR	1	13 (44,80)	16 (55,20)	0,98	9 (33,30)	18 (66,70)	0,70	5 (10,40)	43 (89,60)	0,006**
	2	40 (46,50)	46 (53,50)		24 (28,20)	61 (71,80)		31 (24,80)	94 (75,20)	
	3	15 (46,90)	17 (53,10)		7 (23,30)	23 (76,70)		25 (36,80)	43 (63,20)	
Estadio Clínico	I + II	34 (44,00)	44 (56,00)	0,68	26 (30,00)	62 (70,00)	0,08	18 (21,20)	67 (78,80)	0,26
	III + IV	34 (40,00)	50 (60,00)		15 (18,00)	67 (82,00)		43 (27,70)	112 (72,30)	

Abreviações: IDC, carcinoma ductal invasivo; Grau de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson; HER2, *Human epidermal growth factor receptor type 2*; CK, citoceratina; EGFR, *epidermal growth factor receptor*.

Foram observadas associações com significância estatística entre a positividade de SULF1 com menor número de linfonodos comprometidos ($P=0,03$), com status positivo do receptor de progesterona ($P=0,01$) e com grau de SBR I. Todas estas são características de bom prognóstico em IDC. Estes dados, portanto, sugerem que a presença de SULF1 pode ser um fator de prognóstico favorável em lesões IDC.

Na sequência, foi verificada associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 com a sobrevida global e livre de doença em pacientes com IDC. O tempo de seguimento variou de um mês até 180 meses ($85,98 \pm 61,60$, média \pm desvio padrão). Um total de 163 óbitos e 159 recidivas foram observadas durante este período de acompanhamento. Associações com significância estatística foram observadas para ANAPC13, tanto para a sobrevida global quanto para a sobrevida livre de doença ($P=0,003$ e $P=0,04$, respectivamente (Figura 15). Para os demais marcadores, não foram observadas associações com significância estatística.

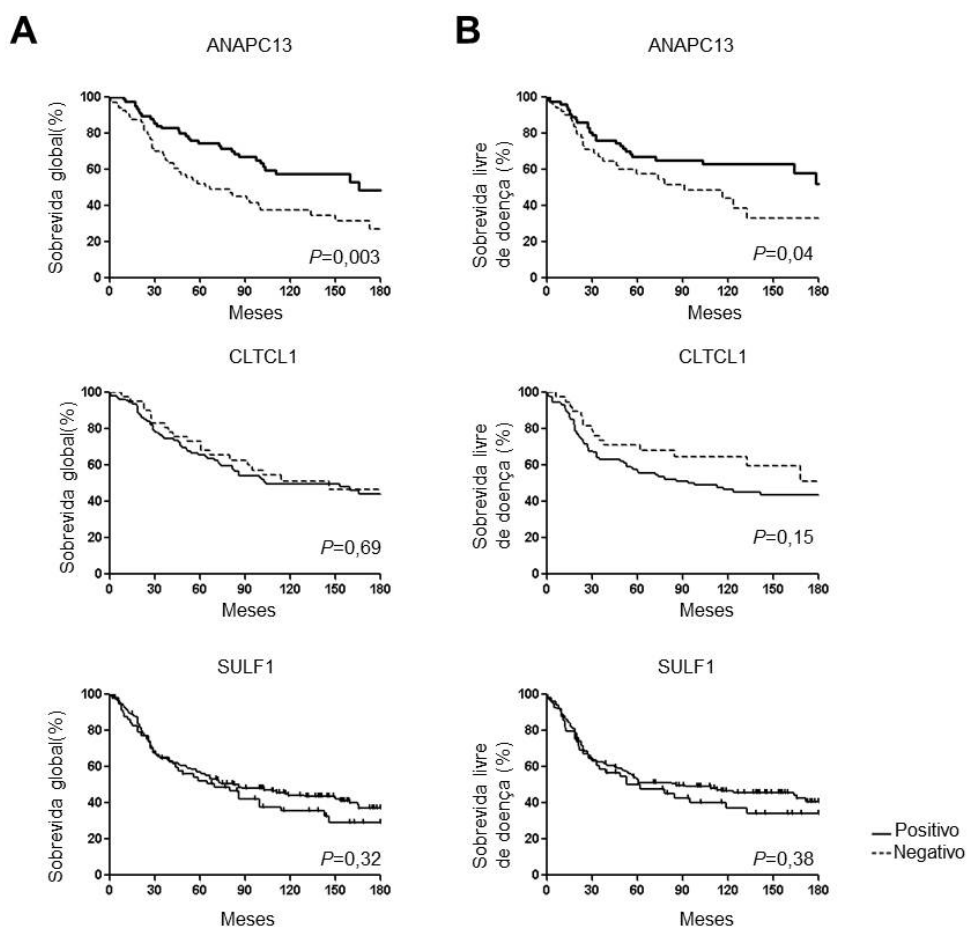


Figura 15 - Curvas de Kaplan-Meier para cálculo de sobrevida. (A), sobrevida global. (B), sobrevida livre de doença. No eixo X, são mostrados os meses de seguimento e no eixo y a probabilidade de sobrevida global e livre de doença.

A presença de ANAPC13 foi associada com maior probabilidade de sobrevida global e livre de doença. Estes resultados sugerem que a presença de ANAPC13 possa ser um fator de prognóstico favorável em IDC.

De acordo com o modelo univariado de regressão de COX, as pacientes com ausência de expressão citoplasmática de ANAPC13 apresentaram um risco duas vezes maior de ir à óbito do que pacientes com alguma expressão citoplasmática desta proteína (HR:2,00, IC 95%: 1,3-3,2). A probabilidade de sobrevida em 5, 10 e 15 anos pode ser visualizada na

Tabela 9. A análise multivariada demonstrou que ANAPC13 é uma variável independente (HR=2,09, IC 95%: 1,3-3,4). Os riscos relativos para morte, estimados pelo modelo de regressão de COX, estão descritos na Tabela 10. Estes dados novamente sugerem que ANAPC13 seja um potencial marcador molecular para IDC.

Tabela 9 - Sobrevida em 5, 10 e 15 anos para marcação negativa e positiva de ANAPC13.

Variável	Categoria	ANAPC13 (%)	
		Negativo	Positivo
Sobrevida global	5 anos	50,40	73,00
	10 anos	34,90	55,90
	15 anos	21,40	43,80
Sobrevida livre de doença	5 anos	51,8	63,20
	10 anos	40,4	61,70
	15 anos	31,40	50,80

Tabela 10 - Fatores prognósticos independentes segundo o modelo de regressão de COX.

Variável	Categoria	HR Bruto (IC-95%) ¹	HR Multivariado (IC-95%) ¹
Grau de SBR	1	1,0	1,0
	2	2,58 (1,2 – 5,3)	2,42 (1,1 – 5,2)
	3	3,60 (1,6 – 8,0)	4,29 (1,8 – 10,1)
Estádio T	T1+T2	1,0	1,0
	T3+T4	2,50 (1,5 – 4,1)	2,26 (1,3 – 3,9)
Variável M	0	1,0	1,0
	1	5,77 (3,2 – 10,2)	4,11 (2,2 – 7,7)
ANAPC13 (marcação citoplasmática)	Positivo	1,0	1,0
	Negativo	2,00 (1,3-3,2)	2,09 (1,3-3,4)

⁽¹⁾ Riscos relativos para morte, com intervalo de confiança 95%. Abreviações: Grau de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson; HR, hazard ratio; T, tumor; M, metástase.

Com base nos dados acima, verificou-se a possível existência de associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13 e as amostras IDC, classificadas de acordo com os subtipos da classificação molecular do carcinoma ductal invasivo: luminal A (n=106), luminal B (n=12), superexpressão de HER2 (n=19), basal (n=12) e não classificáveis (n=19), conforme descrito no item 3.7.2. Para esta classificação, todas as amostras do TMA2 com status HER2 (2+) na IHQ foram avaliadas por FISH. As Tabelas 11 e 12 mostram a associação da marcação citoplasmática de ANAPC13 com variáveis clinicopatológicas.

Tabela 11 - Associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13 e variáveis clinicopatológicas em amostras IDC Luminal A e B.

Variáveis clinicopatológicas	Categoria	Luminal A		P	Luminal B		P
		Negativo, n (%) ¹	Positivo, n (%) ¹		Negativo, n (%) ¹	Positivo, n (%) ¹	
Número de linfonodos comprometidos	≤3	17 (28,30)	43 (71,70)	0,01*	1 (25,00)	3 (75,00)	>,999
	>3	14 (56,00)	11 (44,00)		1 (33,30)	2 (66,70)	
Grau nuclear	1	1 (100,00)	0 (0,00)	NA	0 (0,00)	0 (0,00)	NA
	2	7 (35,00)	13 (65,00)		0 (0,00)	2 (100,00)	
	3	24 (41,40)	34 (58,60)		2 (50,00)	2 (50,00)	
Presença de lesão intraductal	ausente	18 (45,00)	22 (55,00)	0,76	1 (50,00)	1 (50,00)	NA
	presente	7 (50,00)	7 (50,00)		0 (0,00)	0 (0,00)	
Grau de SBR	1	7 (43,70)	9 (56,30)	0,22	0 (0,00)	1 (100,00)	NA
	2	21 (47,70)	23 (52,30)		2 (50,00)	2 (50,00)	
	3	4 (23,50)	13 (76,50)		0 (0,00)	1 (100,00)	
Estadio clínico	I+II	19 (40,00)	29 (60,00)	0,85	2 (67,00)	1 (33,00)	0,52
	III+IV	17 (38,00)	28 (62,00)		3 (33,00)	6 (67,00)	

Abreviações: IDC, Carcinoma ductal invasivo; NA, não avaliável; Grau de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom Richardson. ⁽¹⁾ Percentual considerando número de casos com informação completa. (*) $P < 0.05$.

Tabela 12 - Associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13 e variáveis clinicopatológicas em amostras IDC do subtipo HER2⁺, basal e não classificável.

Variáveis clinicopatológicas	Categoria	Superexpressão de HER2 ⁺		P	Basal		P	Não classificáveis		P
		Negativo, n (%) ¹	Positivo, n (%) ¹		Negativo, n (%) ¹	Positivo, n (%) ¹		Negativo, n (%) ¹	Positivo, n (%) ¹	
Número de linfonodos comprometidos	≤3	6 (50,00)	6 (50,00)	0,31	3 (43,00)	4 (57,00)	NA	2 (20,00)	8 (80,00)	0,06
	>3	1 (16,70)	5 (83,30)		0 (0,00)	2 (100,00)		5 (71,00)	2 (29,00)	
Grau nuclear	1	3 (50,00)	3 (50,00)	NA	0 (0,00)	0 (0,00)	NA	1 (50,00)	1 (50,00)	0,20
	2	6 (46,20)	7 (53,80)		1 (50,00)	1 (50,00)		1 (33,00)	2 (67,00)	
	3	0 (0,00)	0 (0,00)		3 (33,00)	6 (67,00)		7 (47,00)	8 (53,00)	
Presença de lesão intraductal	ausente	6 (50,00)	6 (50,00)	>,999	2 (67,00)	1 (33,00)	>,999	4 (44,00)	5 (56,00)	>,999
	presente	1 (50,00)	1 (50,00)		1 (50,00)	1 (50,00)		1 (50,00)	1 (50,00)	
Grau de SBR	1	3 (75,00)	1 (25,00)	0,37	0 (0,00)	0 (0,00)	NA	1 (25,00)	3 (75,00)	0,17
	2	3 (37,5)	5 (62,50)		2 (29,00)	5 (71,00)		7 (64,00)	4 (36,00)	
	3	2 (33,00)	4 (66,70)		2 (50,00)	2 (50,00)		1 (20,00)	4 (80,00)	
Estadio clínico	I+II	4 (44,00)	5 (56,00)	>,999	1 (33,00)	2 (67,00)	>,999	7 (70,00)	3 (30,00)	0,30
	III+IV	3 (43,00)	4 (57,00)		3 (43,00)	4 (57,00)		2 (33,00)	4 (67,00)	

Abreviações: IDC, Carcinoma ductal invasivo; NA, não avaliável; Grau de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson. (¹) Percentual considerando número de casos com informação completa.

Foi observada associação significativa entre a marcação citoplasmática positiva de ANAPC13 com menor número de linfonodos comprometidos ($P=0,01$), para as amostras classificadas como Luminal A.

Na sequência, foi feita a análise de sobrevida global e livre de doença, considerando a marcação citoplasmática de ANAPC13 nos subtipos da classificação molecular do IDC. Os resultados são apresentados na Figura 16.

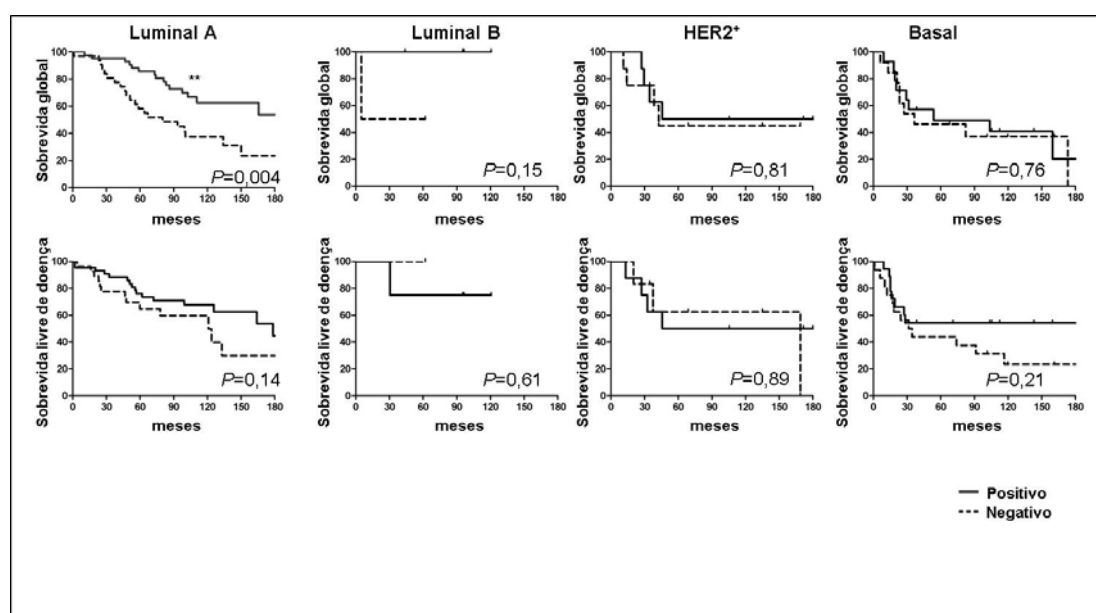


Figura 16 - Curvas de Kaplan-Meier, baseadas na marcação citoplasmática de ANAPC13, para análise de sobrevida global e livre de doença nos subgrupos moleculares de tumores invasivos de mama. (**) $P<0,01$.

Como observado na figura acima, foi verificada associação entre expressão citoplasmática de ANAPC13 e maior probabilidade de sobrevida global para o grupo luminal A ($P=0,004$), sugerindo que ANAPC13 possa ser um candidato a biomarcador destas lesões.

Por último, foi então verificada a associação entre a marcação citoplasmática de ANAPC13 e sobrevida global e livre de doença nas

pacientes grau de SBR (1, 2 ou 3) e número de linfonodos comprometidos (≤ 3 ou > 3) (Anexo 5). Foi observada associação estatisticamente significativa entre positividade de ANAPC13 e maior probabilidade de sobrevida global em pacientes com grau 2 e 3 de SBR ($P=0,0064$ e $P=0,018$, respectivamente), o que é muito interessante já que grau de SBR é uma característica histopatológica importante para determinar prognóstico em IDC (RAKHA et al. 2010). Estes resultados reforçam o potencial de ANAPC13 como marcador em DC.

4.2 GENE ANAPC13

ANAPC13 demonstrou grande potencial como marcador molecular, já que está diferencialmente expresso entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC, e em lesões IDC a marcação citoplasmática positiva de ANAPC13 é sugestiva de bom prognóstico, especialmente no subtipo luminal A. Em função dos resultados promissores encontrados, este gene foi estudado em maior profundidade neste trabalho.

4.2.1 Análise de rastreamento de mutação e de deleção cromossômica do gene ANAPC13

Foram investigados possíveis eventos, que pudessem contribuir com a diminuição de *ANAPC13* ao longo da progressão do DC. Para isso, primeiramente foi verificado se este processo poderia, pelo menos em parte estar relacionado com a presença de mutações na região codificadora deste

gene. Foram investigadas alterações por substituição de bases que levem a formação de um códon de parada, UGA, UAA e UAG, e/ou deleção ou inserção, resultando na troca de matriz de leitura, e/ou formação de um códon de parada prematuro, o que pode gerar proteínas truncadas, e conseqüentemente, não funcionais. O DNA tumoral proveniente de 42 amostras de IDC foi utilizado para o rastreamento de mutações no gene *ANAPC13*. Foram desenhados cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores (item 3.9) para permitir o sequenciamento dos três éxons do gene e dos sítios de *splice* presentes nas bordas entre os éxons e íntrons. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Lista de alterações encontradas no gene *ANAPC13*

Alteração Genômica	Região de RNAm	Genótipo	Frequência, n (%)
c.-704G>C	5'UTR	Homozigoto	27 (64,2%)
		Heterozigoto	10 (23,8%)
c.-702_700 del GGG	5'UTR	Homozigoto	36 (85,7%)
		Heterozigoto	0 (0,0%)
c.-700 del G	5'UTR	Homozigoto	1 (2,4%)
		Heterozigoto	0 (0,0%)
c-531 C>G	5'UTR	Homozigoto	1 (2,4%)
		Heterozigoto	0 (0,0%)
c-662C>T	5'UTR	Homozigoto	1 (2,4%)
		Heterozigoto	0 (0%)
c.*3C>T	3'UTR	Homozigoto	1 (2,4%)
		Heterozigoto	0 (0%)
c.*193G>A	3'UTR	Homozigoto	1 (2,4%)
		Heterozigoto	0 (0,0%)

Abreviações: UTR, região não traduzida.

No total, foram encontradas sete alterações, nas regiões não codificantes 5'UTR e 3' UTR. Uma deleção (c.-700_702 del GGG) e uma substituição (c.-704G>C), ambas localizadas na região 5'UTR do éxon 1, foram as alterações mais frequentes, encontradas em 85,7% e em 88% das pacientes, respectivamente. Nenhuma alteração foi encontrada na região codificante de *ANAPC13*, o que sugere que mutações nesta região são, no

mínimo, eventos pouco frequentes para *ANAPC13*. A Figura 17 é uma representação esquemática das alterações encontradas em *ANAPC13*.

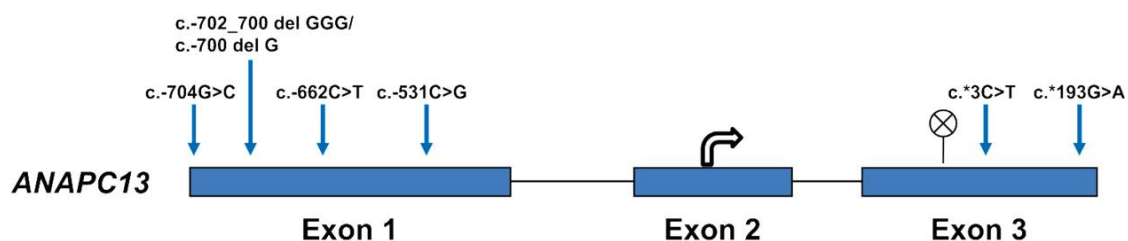




Figura 17 - Representação esquemática das sete alterações encontradas na sequência genômica de *ANAPC13*. Os retângulos em azul representam os éxons e a linha preta representa os íntrons. Os símbolos  e  indicam o início e o fim da tradução, respectivamente.

Na sequência, foi investigada deleção na região cromossômica de *ANAPC13*, avaliando 33 das 42 amostras IDC por aCGH. Não foram observadas perdas da região cromossômica de *ANAPC13* (Figura 18).

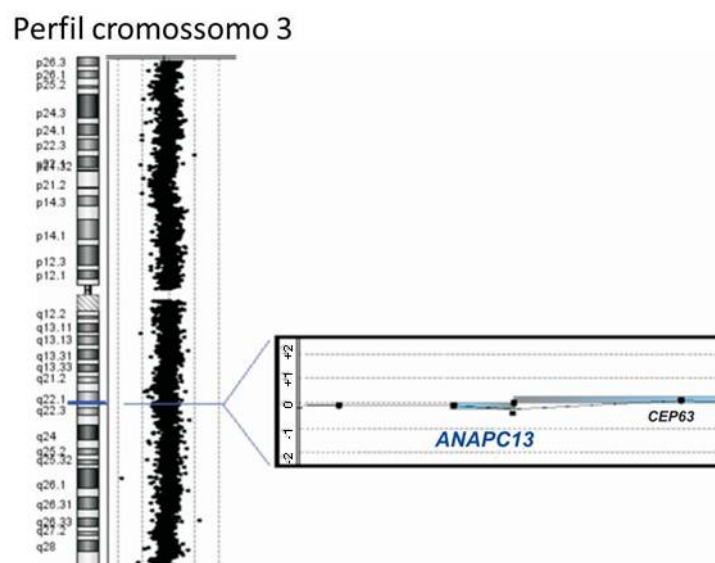


Figura 18 - Perfil de um segmento genômico em 3q22.2. A figura descreve a localização de três sondas, mapeadas na sequência do gene *ANAPC13* em uma das amostras IDC analisadas. Os valores de log próximos a 0 mostram que a região investigada tem um número de cópias equivalente ao do genoma completo deste tumor, o que sugere que não há deleções desta região.

4.2.2 Investigação de mecanismos envolvidos com a redução de expressão de *ANAPC13* ao longo da progressão do DC

Foram investigados possíveis mecanismos envolvidos na redução da expressão de *ANAPC13* ao longo da progressão do DC. A presença de metilação em sequências promotoras ou regulatórias pode estar correlacionada com a repressão da expressão gênica. Por esta razão, foi verificado se havia efeito da regulação epigenética por metilação da região promotora de *ANAPC13*.

A busca da presença de ilhas CpG na região promotora (3kb à jusante da região transcrita) e regiões internas do gene *ANAPC13*, utilizando o programa Methprimer (LI e DAHIYA 2002), identificou três ilhas CpG na

região promotora e três ilhas na porção interna do gene, duas no éxon 1 e uma no éxon 3 (Figura 19).

Para investigar se a modulação da expressão de *ANAPC13* poderia ser influenciada por metilação do DNA, o nível de expressão deste gene foi avaliado por RT-qPCR em linhagens celulares tratadas e não tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Este agente é um análogo da citosina e, quando incorporada ao DNA, se liga irreversivelmente à DNA metil transferase (DNMT), enzima que controla a transferência do grupamento metil (COLOT e ROSIGNOL 1999). Assim, o tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina reduz os níveis de metilação existentes, podendo reativar a expressão de genes controlados por este processo.

Para esta análise, escolhemos as linhagens de mama MCF-10A e MCF-7 para verificar se ocorria reativação da expressão de *ANAPC13* após o tratamento com o agente desmetilante. Também incluímos a linhagem tumoral de rim, HEK-293, a qual foi previamente estudada por nosso grupo de pesquisa e apresentou eficácia do tratamento com o agente desmetilante (MARTINS 2011). Os resultados podem ser visualizados na Figura 20.

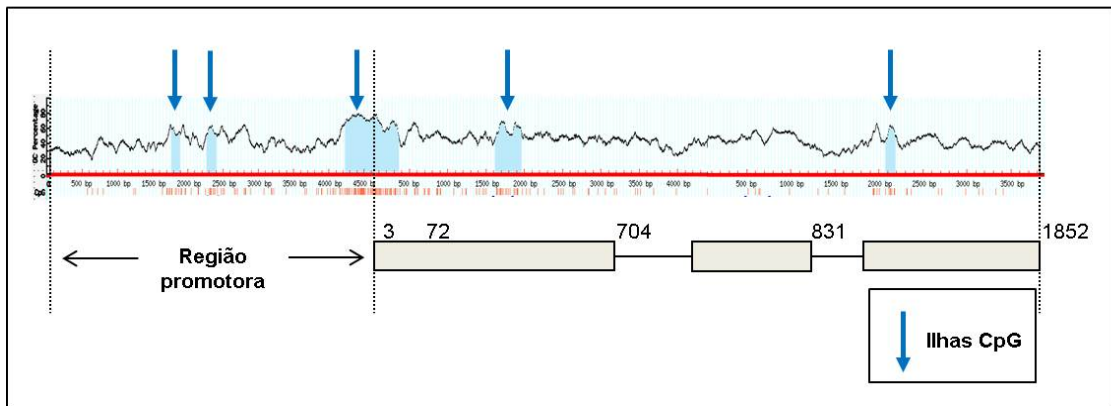


Figura 19 - Ilhas CpGs na região promotora e interna do gene *ANAPC13*.

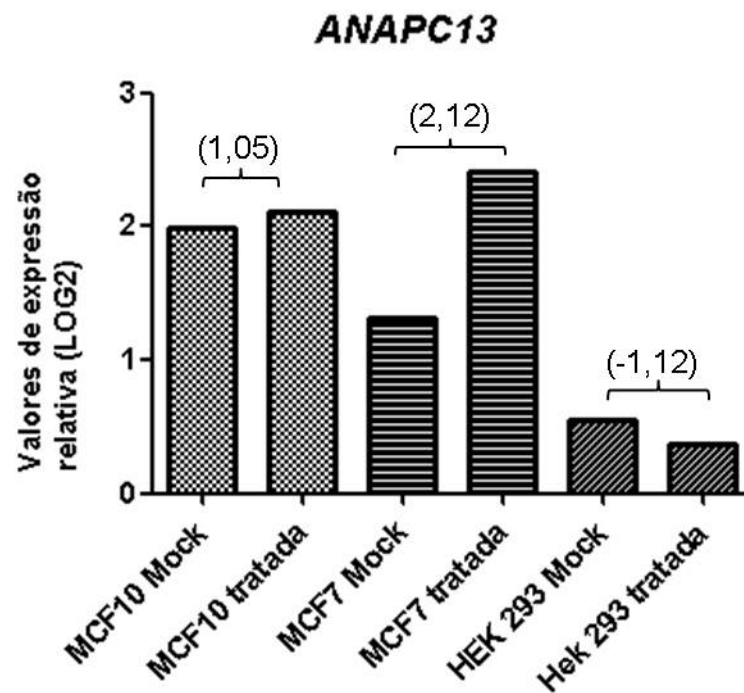


Figura 20 - Expressão de *ANAPC13* por RT-qPCR em linhagens tratadas e não tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Abreviações: Mock, linhagens controles não tratadas. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre as linhagens analisadas.

Para o cálculo de expressão relativa, foram considerados os genes *GAPDH* e *GUSB*, mais estáveis segundo a ferramenta geNorm (item 3.6.3). Considerando um critério de diferença de expressão (*fold change* $\geq |2|$), foi observada reativação da expressão de *ANAPC13* na linhagem MCF-7 tratada em relação a não tratada (Mock) com o agente desmetilante. Este resultado sugere que a modulação da expressão de *ANAPC13* pode estar sofrendo influência de regulação epigenética por metilação do DNA. Entretanto, é necessária a definição dos sítios CpG envolvidos nesta regulação para uma investigação mais profunda do papel da metilação neste processo.

4.2.3 Relação entre a expressão de *ANAPC13* e o número de *Copy Number Alterations* (CNAs)

Devido ao fato do gene *ANAPC13* ser uma das subunidades do complexo promotor de Anáfase (APC/C), o qual está envolvido na separação de cromátides irmãs durante a transição metáfase-anáfase do ciclo celular, através da ativação da enzima cisteína-protease separase (NASMYTH 2001), foi investigado se a menor expressão de *ANAPC13* poderia estar associada com aumento da instabilidade genômica durante a progressão do DC.

Primeiramente, foi avaliada a expressão de *ANAPC13* em 33 das 42 amostras IDC por RT-qPCR. Para o cálculo de expressão relativa, foram considerados os genes *ACTB*, *HUPO*, *GUSB* e *HPRT*, estáveis segundo a ferramenta geNorm (item 3.6.3). Foi calculada a média do valor de

expressão relativa obtido para as 33 amostras. Os casos com valor acima da média foram considerados com maior expressão de *ANAPC13* e as amostras com valor abaixo da média foram consideradas com menor expressão deste gene. Um total de 14 e 19 amostras apresentaram baixa e alta expressão de *ANAPC13*, respectivamente. Os dois grupos de amostras apresentaram uma diferença de expressão de 3,71 vezes ($P < 0,0001$) (Figura 21, A). Na sequência, as amostras foram avaliadas por aCGH. Associação estatisticamente significativa foi observada entre amostras com menor expressão de *ANAPC13* e maior número de CNAs ($P=0,048$) (Figura 21, B). O padrão de alterações totais encontradas nos grupos que apresentam maior e menor expressão de *ANAPC13* é mostrado na Figura 21, C. O número de ganhos e perdas, em cada grupo, está descrito na Tabela 14. O total de alterações em cada cromossomo é mostrado na Tabela 15.

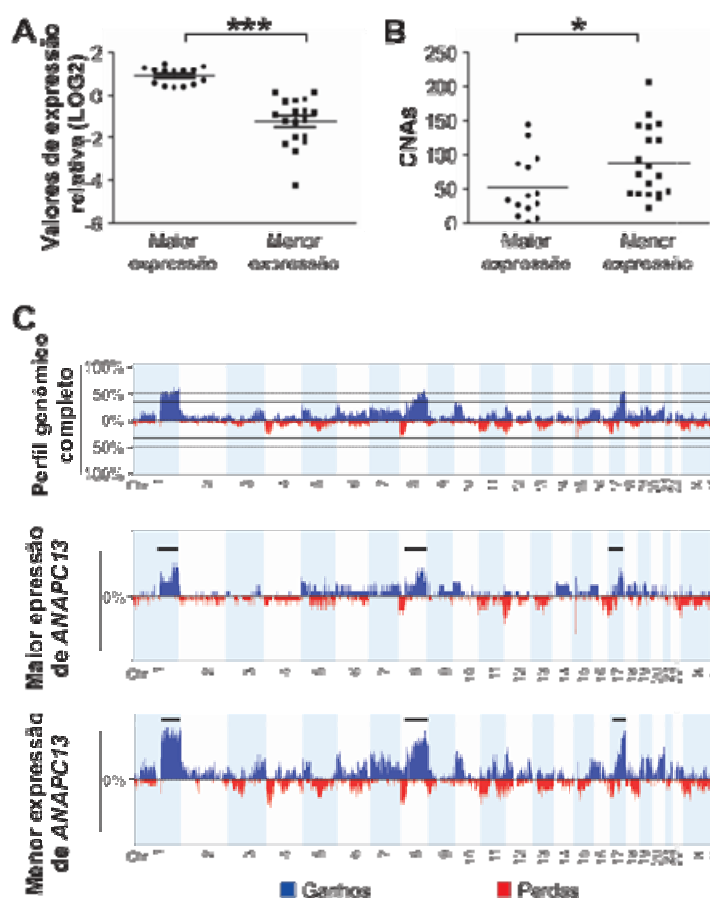


Figura 21 - Expressão de *ANAPC13* e instabilidade genômica em IDC. (A), expressão relativa em casos IDC com maior e menor expressão de *ANAPC13*. (B), Número de CNAs em amostras IDC com alta e baixa expressão de *ANAPC13*. (C), O eixo X corresponde à região genômica dos cromossomos 1 ao 22, X e Y. O eixo Y representa o percentual de ganhos (plotados em azul acima da linha de base 0%) e perdas (plotadas em vermelho abaixo da linha de base 0%). O painel mais acima mostra ganhos e perdas nas 33 amostras de IDC avaliadas. O painel do meio e o mais abaixo mostram ganhos e perdas em cada grupo (maior e menor expressão de *ANAPC13*), respectivamente. Amostras com menor expressão apresentaram um padrão de alterações genômicas, caracterizado principalmente por um aumento da frequência de ganhos em 1q (1q23.1-1q32.1), 8q, and 17q (17q24.2) (representado por barras pretas). Abreviações: Chr, cromossomo; CNAs, Copy Number Alterations. (*) $P < 0,05$; (***) $P < 0,001$.

Tabela 14 - Número de perdas e ganhos nas amostras com maior e menor expressão de *ANAPC13*.

Amostras de Carcinoma ductal invasivo de mama	Número total de amostras avaliadas	Ganhos	Perdas	Total de alterações
Maior expressão de <i>ANAPC13</i>	14	355	377	732
Menor expressão de <i>ANAPC13</i>	19	767	906	1673

Tabela 15 - Número de alterações totais encontrados em cada cromossomo

Cromossomo	Total de alterações cromossômicas	Perdas, n(%)	Ganhos, n(%)
chr 1	220	147 (66,8)	73 (33,2)
chr 2	121	59 (48,8)	62 (51,2)
chr 3	182	84 (46,2)	98 (53,8)
chr 4	166	35 (21,1)	131 (78,9)
chr 5	150	44 (29,3)	106 (70,6)
chr 6	163	74 (45,4)	89 (54,6)
chr 7	87	61 (70,1)	26 (29,9)
chr 8	230	127 (55,2)	103 (44,8)
chr 9	78	21 (26,9)	57 (73,1)
chr 10	129	56 (43,4)	73 (56,6)
chr 11	181	54 (29,8)	127 (70,2)
chr 12	143	67 (46,8)	76 (53,2)
chr 14	86	27 (31,4)	59 (68,6)
chr 15	62	29 (46,8)	33 (53,2)
chr 16	82	33 (40,2)	49 (59,8)
chr 17	179	94 (52,5)	85 (47,5)
chr 18	70	20 (28,6)	50 (71,4)
chr 19	66	36 (54,5)	30 (45,5)
chr 20	56	36 (64,3)	20 (35,7)
chr 21	26	12 (46,2)	14 (53,8)
chr 22	43	13 (30,2)	30 (69,8)
chr X	159	50 (31,4)	109 (68,6)
chr Y	51	23 (45,1)	28 (54,9)

Como mostrado na Figura 21, o maior número de ganhos em amostras com menor expressão de *ANAPC13* foi observado nos cromossomos 1 (1q23.1-1q32.1), 8 e 17 (17q24.2).

Foi então verificado se na nossa amostra, havia predominância de algum dos subtipos da classificação molecular do IDC, especialmente casos triplo-negativos, os quais apresentam maior instabilidade genômica (HU et al. 2009 e BERGAMASCHI et al. 2006), interferindo, portanto, na associação encontrada. Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Análise da expressão de *ANAPC13* nos subtipos moleculares de câncer de mama

Subgrupos moleculares	Maior expressão de <i>ANAPC13</i> , n (%)	Menor expressão de <i>ANAPC13</i> , n (%)	P
Luminal A	6 (50,00)	6 (50,00)	0,36
Luminal B	3 (75,00)	1 (25,00)	
HER2 ⁺	2 (28,60)	5 (72,40)	
Triplo negativo	3 (30,00)	7 (70,00)	

Como mostrado na tabela acima, não há predominância de nenhum dos subtipos da classificação molecular na nossa casuística. Os resultados, portanto, sugerem uma possível associação entre a perda de expressão de *ANAPC13* e maior instabilidade genômica em IDC.

Parte dos dados apresentados até o momento foi reunido em um manuscrito intitulado: *“Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: early events in the progression of preinvasive ductal carcinoma of the breast”*

publicado na revista *Translational Oncology* (Volume 5, Number 2, Abril 2012, pp.113-123) (anexo 7).

4.2.4 Investigação da presença de variantes de *splicing* alternativo do gene *ANAPC13*

O gene *ANAPC13* possui três variantes de *splicing* alternativo, as quais diferem no tamanho do primeiro éxon (Figura 22).

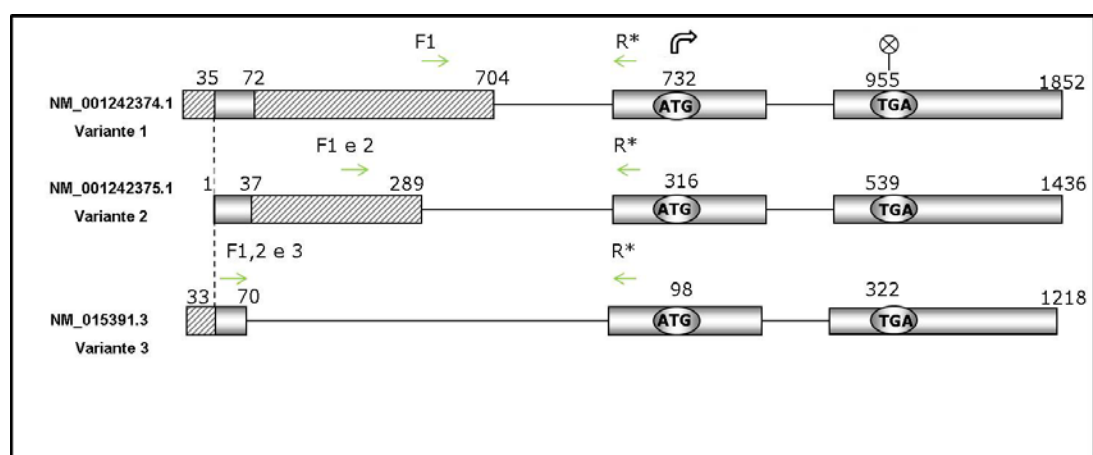


Figura 22 - Variantes de *splicing* de *ANAPC13*. As áreas sombreadas representam regiões comuns entre as três variantes. As setas verdes indicam a localização dos pares de oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para avaliar a presença de variantes de *splicing*. Os símbolos \curvearrowright e \otimes indicam o início e o fim da tradução, respectivamente.

Como mostrado na figura acima, as três variantes apresentam os mesmos sítios de início e fim de tradução, codificando uma proteína de mesmo tamanho, com 74 aminoácidos. Para uma análise preliminar destas variantes, primeiramente avaliamos diferentes linhagens celulares de mama (MCF10A, HB4a, C5.2, MCF-7, SK-BR-3 e MDA-MB-231) através de RT-

PCR, utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores (F1, 2 e 3) e (R*) (Quadro 5). Os resultados são mostrados na Figura 23.

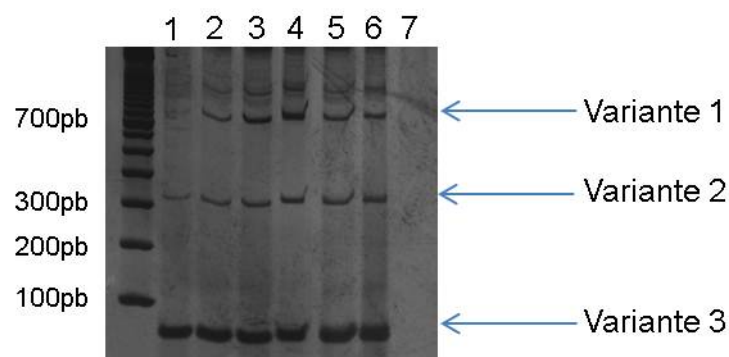


Figura 23 - Análise da expressão de variantes de *splicing* de *ANAPC13* através de RT-PCR. Os números representam: 1- MCF-7; 2-MCF-10A 3- HB4a; 4-C5.2; 5- MDA-MB-231; 6-SK-BR-3; 7-controle negativo . Gel de poli-acrilamida 8%.

Com o uso de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região do evento de *splicing* alternativo, foram encontradas as três variantes de *splicing* conhecidas para *ANAPC13*, com fragmentos de tamanhos esperados em 707pb (variante 1), 326 pb (variante 2) e 75pb (variante 3) (Quadro 5). As três variantes foram observadas tanto em linhagens normais quanto em tumorais de mama. As reações com oligonucleotídeos iniciadores específicos para as variantes 1 e 2 também resultaram em fragmentos de tamanhos esperados (Quadro 5) (Figura 24).

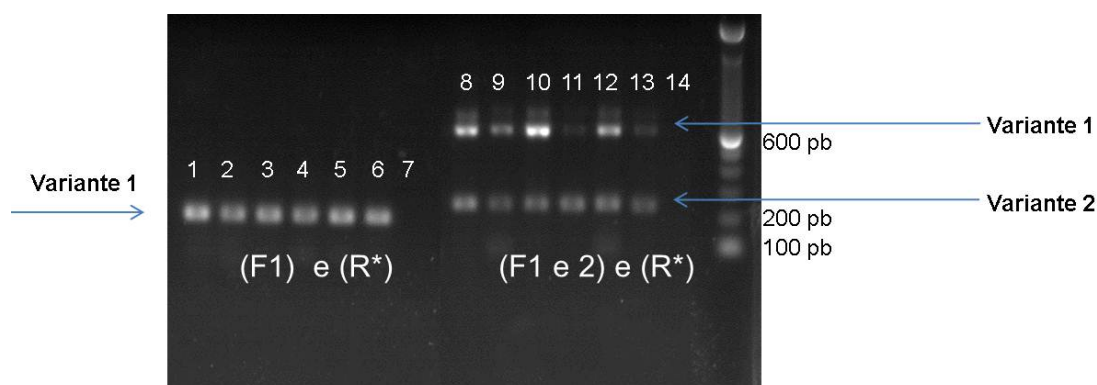


Figura 24 - Reações de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para amplificação das variantes de *splicing* 1 e 2 do gene *ANAPC13*. Os números para a reação (F1) e (R*) representam: 1- HB4a; 2- MCF-10A; 3- C5.2; 4- MCF-7; 5- MDA-MB-231; 6- SK-BR-3; e 7- controle negativo. Os números para a reação (F1 e 2) e (R*) representam: 8- Hb4a; 9- MCF-10A; 10- C5.2; 11- MCF-7; 12- MDA-MB-231; 13- SK-BR-3; 14- controle negativo. Gel de agarose 1%.

Na sequência, a presença das variantes de *splicing* foi avaliada em 40 das 42 amostras IDC com os oligonucleotídeos (F1, 2 e 3) e R* que amplificam todas as variantes (Figura 23). A variante 3 foi encontrada em 100% dos casos, enquanto que as variantes 1 e 2 foram encontradas em 60% e em 67,5% dos casos, respectivamente (Figura 25).

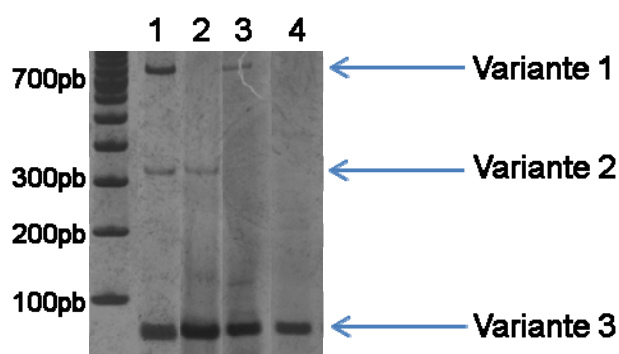


Figura 25 - Representação de variantes de *splicing* alternativo do gene *ANAPC13* em amostras IDC. Os números representam: (1)- amostras com as variantes 1, 2 e 3; (2)- amostra com as variantes 2 e 3; (3)- amostra com as variantes 1 e 3; (4)- amostra apenas com a variante 3.

Na sequência, as 40 amostras IDC foram divididas segundo a expressão de *ANAPC13*, avaliada por RT-qPCR. Esta análise resultou em 22 amostras com baixa expressão de *ANAPC13* e 18 amostras com mais alta expressão deste gene. A presença das variantes de *splicing* de *ANAPC13* foi novamente avaliada, considerando estes dois grupos. Os resultados são mostrados na Figura 26.

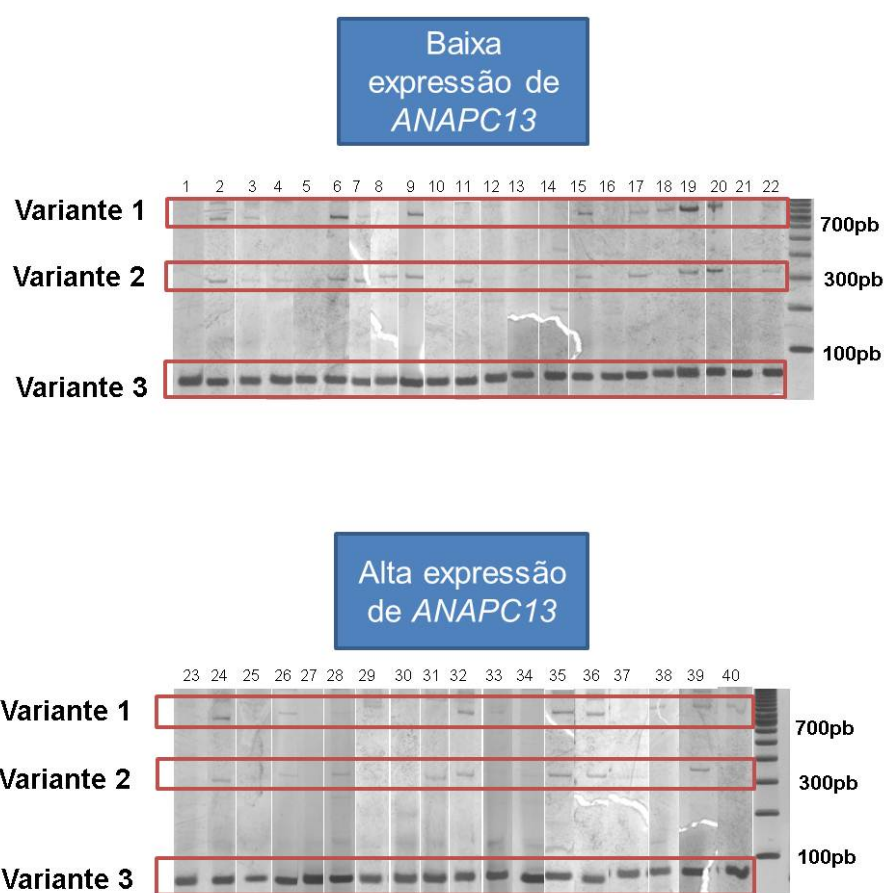


Figura 26 - Variantes de *splicing* de *ANAPC13* nos grupos de amostras com baixa e alta expressão deste gene. Os números 1 a 22 representam amostras com baixa expressão de *ANAPC13* enquanto que os números 23 a 40 representam amostras com mais alta expressão deste gene.

Como já mencionado, a variante 3 está presente em 100% das amostras. A variante 1 foi observada em 10 das 22 amostras do grupo com baixa expressão de *ANAPC13* (45,40%) e em 10 das 18 amostras do grupo com alta expressão deste gene (55,50%). A variante 2 foi vista em 15 das 22 amostras do grupo com baixa expressão (68,20%) e em 10 das 18 amostras do grupo com alta expressão de *ANAPC13* (55,50%). As frequências das variantes entre os dois grupos foram comparadas utilizando o teste de qui-quadrado, com resultado não estatisticamente significativo ($P=0,79$).

Os resultados sugerem que a variante 3 é a mais abundante e que não há diferenças significativas em relação à frequência das variantes 1 e 2 nos grupos com baixa e alta expressão de *ANAPC13*. Entretanto, estes resultados devem ser avaliados por outras técnicas que permitam quantificar com mais acurácia variantes de *splicing* presentes em uma mesma reação.

4.2.5 Ensaios funcionais com o gene *ANAPC13*

As linhagens celulares MCF-10A, HB4a, C5.2, MCF-7, SK-BR-3 e MDA-MB-231 foram cultivadas, conforme descrito no item 3.11. Simultaneamente à extração do extrato proteico, foi realizada a extração do RNA total para uma análise de expressão por RT-qPCR. Os resultados são mostrados na Figura 27.

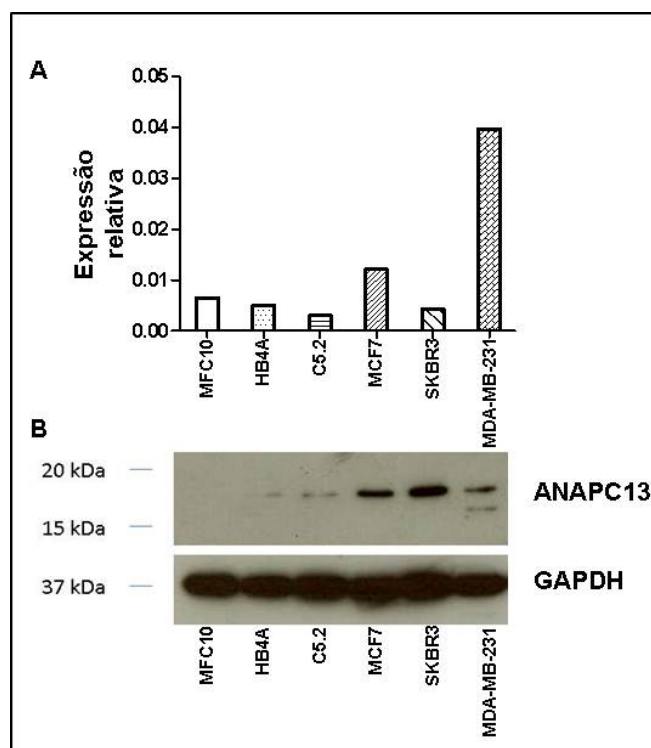


Figura 27 - Expressão de *ANAPC13* em linhagens de mama pelas técnicas de RT-qPCR e Western Blot. (A), RT-qPCR. (B), Western Blot.

Os resultados de RT-qPCR mostram maior expressão de *ANAPC13* na linhagem MDA-MB-231, seguida pela linhagem MCF-7. Os resultados do ensaio de Western Blot demonstram maior expressão da proteína na linhagem SK-BR-3, seguida pela linhagem MCF-7. Portanto, há certa discordância entre os níveis transcricionais e proteicos.

Para o ensaio de proliferação *in vitro* em tempo real, utilizamos linhagem MCF-7, para avaliar o efeito da superexpressão e silenciamento de *ANAPC13*. A linhagem MCF-7 apresentou expressão intermediária de *ANAPC13* tanto pela técnica de RT-qPCR quanto pela técnica de Western Blot. Além disso, a linhagem MCF-7 apresenta expressão positiva de receptores hormonais e negativa de HER2, sendo classificada como luminal

A (KAO et al. 2009). Por esta razão, é interessante avaliar o efeito da superexpressão e silenciamento de *ANAPC13* nesta linhagem, já que foi observada associação entre a positividade de ANAPC13 e expressão de ER e PR no TMA composto por lesões intraductais e ainda a presença de ANAPC13 foi associada com maior probabilidade de sobrevida global em amostras luminais A.

Linhagens MCF-7 estáveis, apresentando superexpressão (OE-ANAPC13) e silenciamento do gene *ANAPC13* (Sil-ANAPC13) foram geradas através da clonagem de sequências senso e anti-senso de *ANAPC13* no vetor pcDNA3.1/*myc*-His A, respectivamente, e selecionadas conforme descrito no item 3.17. Linhagens sem transfecção (MCF-7) e transfectadas apenas com o vetor pcDNA3.1/*myc*-His A vazio (Mock) foram utilizadas como controles. A presença das construções de interesse foi verificada através de PCR com oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região do sítio múltiplo de clonagem (SMC) do vetor pcDNA3.1/*myc*-His A (Quadro 6) (Figura 28, A). A presença da construção anti-senso foi também avaliada por RT-PCR, através de síntese de cDNA com oligonucleotídeos complementares para ANAPC13 anti-senso, e como controle foi utilizado GAPDH (Figura 28, B). A expressão por RNAm e proteína foi avaliada por RT-qPCR (Figura 28, C) e Western Blot (Figura 28, D), respectivamente.

Os resultados demonstram que as linhagens transfectadas OE-ANAPC13 e Sil-ANAPC13 apresentam superexpressão e silenciamento parcial de *ANAPC13*, respectivamente. Desta forma, foi realizada uma

análise preliminar do papel funcional de *ANAPC13*, através de um ensaio de proliferação *in vitro* em tempo real.

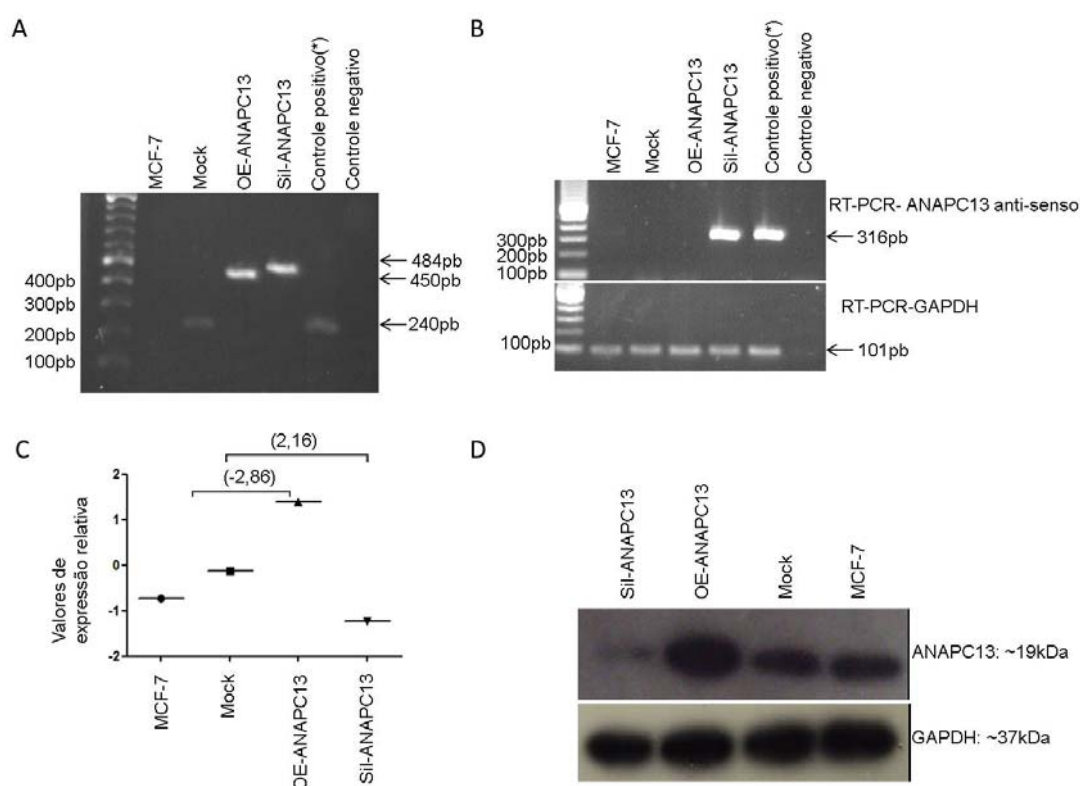


Figura 28 - Análise da transfecção de MCF-7 com seqüências senso e anti-senso de *ANAPC13*. (A), presença das construções senso (~450pb) e anti-senso (~484pb) nas linhagens OE-ANAPC13 e Sil-ANAPC13, respectivamente, analisadas através de PCR com oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pcDNA3.1/*myc*-His A. (*) Controle positivo, vetor pcDNA3.1/*myc*-His A fechado (~240pb). (B), o painel mais acima mostra a expressão do transcrito *ANAPC13* anti-senso apenas nas células Sil-ANAPC13 (~316pb). (*) Controle positivo, seqüência *ANAPC13* anti-senso clonada no vetor pcDNA3.1/*myc*-His A. O painel mais abaixo mostra a expressão de GAPDH, utilizado como controle no experimento de RT-PCR. (*) Controle positivo, linhagem celular de mama normal (Hb4a). (C), expressão de *ANAPC13* nas linhagens MCF-7, Mock, OE-ANAPC13 e Sil-ANAPC13 por RT-qPCR. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre Mock x OE-ANAPC13 e entre Mock x Sil-ANAPC13. (D), expressão de *ANAPC13* nas linhagens MCF-7, Mock, OE-ANAPC13 e Sil-ANAPC13 por Western Blot. Abreviações: MCF-7, linhagem celular MCF-7 não transfectada; Mock, células MCF-7 transfectadas com o vetor pcDNA3.1/*myc*-His A vazio; OE-ANAPC13, células MCF-7 que superexpressam *ANAPC13*; Sil-ANAPC13, células MCF-7 que apresentam silenciamento de *ANAPC13*.

- **Ensaio de proliferação celular *in vitro* em tempo real**

O ensaio de proliferação celular em tempo real foi realizado no equipamento RTCA DP (Roche®), conforme descrito no item 3.18. Os resultados podem ser visualizados na Figura 29.

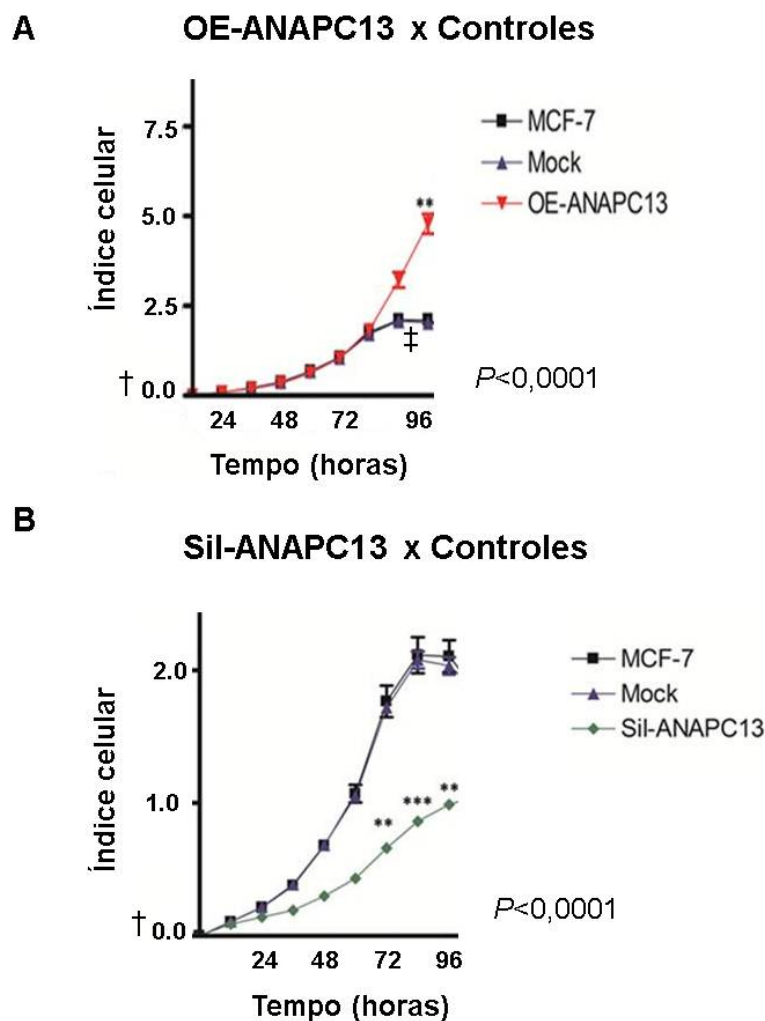


Figura 29 - Ensaio de proliferação celular em tempo real em até 96 horas de incubação. (A), Comparação entre OE-ANAPC13 e linhagens Mock e MCF-7 no ensaio de proliferação em tempo real. (B), Comparação entre Sil-ANAPC13 e linhagens Mock e MCF-7 no ensaio de proliferação em tempo real. Abreviações: MCF-7, linhagem celular MCF-7 não transfectada; Mock, células MCF-7 transfectadas com o vetor pcDNA3.1/*myc*-His A vazio; OE-ANAPC13, células MCF-7 que superexpressam *ANAPC13*; Sil-ANAPC13, células MCF-7 que apresentam silenciamento de *ANAPC13*. (†), inóculo inicial correspondente a $2,5 \times 10^3$ células; (‡), sobreposição das curvas referentes às linhagens MCF-7 e Mock; (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$.

Como mostrado na Figura 29, foram observadas diferenças significativas entre as linhagens OE-ANAPC13 e Sil-ANAPC13 em relação aos controles MCF-7 e Mock. A linhagem com superexpressão de *ANAPC13* (OE-ANAPC13) apresenta maior índice proliferativo e o contrário foi observado para a linhagem com silenciamento de *ANAPC13* (Sil-ANAPC13).

4.2.6 Análise das linhagens celulares por cDNA *microarray*

Para identificar genes modulados pela superexpressão e pelo silenciamento de *ANAPC13*, as linhagens MCF-7, Mock, OE-ANAPC13 e Sil-ANAPC13 foram avaliadas por cDNA *microarray*. Com o objetivo de avaliar a qualidade do experimento de cDNA *microarray*, inicialmente foi realizada uma análise de correlação de *Pearson* entre as lâminas controles (Teste Cy3/ referência Cy5) e *dye-swap* (Teste Cy5/ referência Cy3). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 17.

Tabela 17 - Correlação de *Pearson* entre lâminas controles e *dye-swap* para cada amostra

	Lâmina controle	MCF7	Mock	OE-ANAPC13	Sil-ANAPC13
Lâmina <i>Dye-swap</i>					
MCF7		0,961	0,846	0,902	0,849
Mock		0,847	0,969	0,865	0,896
OE-ANAPC13		0,895	0,860	0,963	0,874
Sil-ANAPC13		0,852	0,902	0,883	0,968

Abreviações: MCF-7, linhagem celular MCF-7 não transfectada; Mock, células MCF-7 transfectadas com o vetor pcDNA3.1/*myc*-His A vazio; OE- ANAPC13, células MCF7 que superexpressam *ANAPC13*; Sil-ANAPC13, células MCF-7 que apresentam silenciamento de *ANAPC13*.

Como observado na Tabela 17, altos valores de correlação ($>0,96$) foram obtidos tanto nas lâminas controles quanto nas *dye-swap* (replicatas) para as mesmas amostras, o que sugere boa qualidade experimental. Portanto, a média das lâminas controle e *dye-swap* foi considerada para análise de cada amostra.

As 60.000 sondas presentes na plataforma de cDNA *microarray* foram avaliadas seguindo o controle de qualidade descrito no item 3.20.4, restando 18266 sondas para a análise. Na sequência, um grupo de 1081 genes foi identificado como diferencialmente expresso ($fold\ change \geq |2|$) entre MCF-7 e Mock. Estes genes foram filtrados da análise, para eliminar modulações de expressão não causadas pela superexpressão ou pelo silenciamento de *ANAPC13*, excluindo, portanto, possíveis artefatos.

Foi então verificado o perfil de expressão utilizando o programa *Short Time-series Expression Miner* (STEM), o qual é capaz de comparar ou agrupar genes que apresentam comportamento de expressão semelhante em uma análise serial.

Neste experimento, o programa STEM foi utilizado para identificar perfis de expressão de genes em três situações que mimetizam a expressão crescente de *ANAPC13* na célula: expressão baixa (Sil-*ANAPC13*); intermediária (Mock) e alta (OE-*ANAPC13*).

Após determinar os perfis de expressão, foi avaliada a super-representação de processos biológicos nos perfis encontrados, com base no *Gene Ontology* (GO). Foram identificados dois perfis de expressão, A (52 genes) e B (79 genes), com genes apresentando comportamento

semelhante ao *ANAPC13*, ou seja, co-regulados ao *ANAPC13*, e com enriquecimento significativo de processos biológicos (Figura 30).

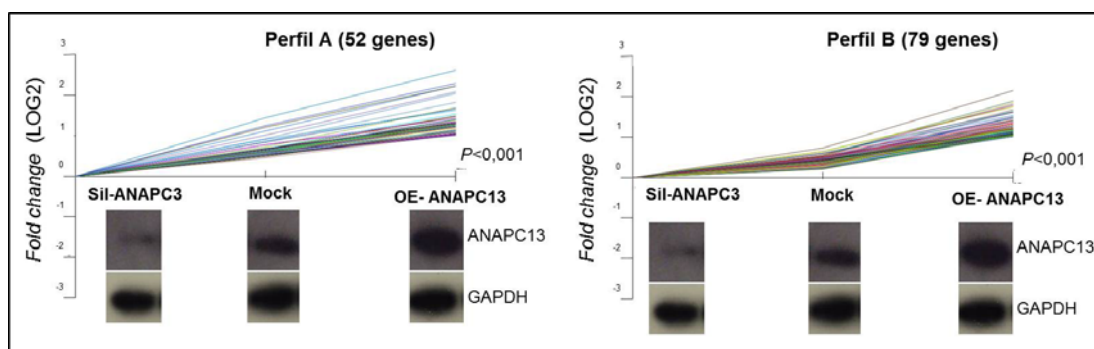


Figura 30 - Perfis de expressão, com enriquecimento significativo de processos biológicos, identificados pelo programa STEM. Abaixo de cada perfil, estão os dados de expressão de *ANAPC13* nas linhagens, avaliados por Western Blot. Abreviações: Mock, células MCF-7 transfectadas com o vetor pcDNA3.1/*myc*-His A vazio; OE- *ANAPC13*, células MCF7 que superexpressam *ANAPC13*; Si-*ANAPC13*, células MCF-7 que apresentam silenciamento de *ANAPC13*.

Foi observado um enriquecimento de processos biológicos relacionados ao ciclo celular, tais como: mitose, fase M do ciclo celular, divisão nuclear, organização do fuso mitótico, organização do citoesqueleto, organização de cromossomos, regulação do ciclo celular, divisão celular, segregação de cromossomos. A lista completa de genes dos perfis A e B está descrita no Anexo 6.

5 DISCUSSÃO

O carcinoma ductal de mama (DC) inclui um grupo heterogêneo de tumores e pode se manifestar tanto na forma *in situ* (DCIS) e/ou invasiva (IDC). A progressão desta doença é um processo composto de múltiplas etapas, caracterizadas pelo acúmulo de anormalidades genéticas, em uma série de estágios histopatológicos, denominados atipia epitelial plana, seguido por hiperplasia ductal atípica, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasivo, o qual pode desencadear a doença metastática, e morte da paciente (WELLINGS e JENSEN 1973; WELLINGS et al. 1975).

Em um experimento prévio de cDNA *microarray*, combinado com microdissecção a laser, nosso grupo de pesquisa observou que a maior parte das diferenças moleculares que surgem nas células epiteliais, durante a progressão do DC, ocorrem entre duas lesões morfologicamente similares, DCIS puro e o componente *in situ* de uma lesão que coexiste com o carcinoma ductal invasivo (DCIS-IDC). Por outro lado, maior similaridade, do ponto de vista molecular, foi observada entre o componente *in situ* do DCIS-IDC e lesões IDC. Estes dados sugerem que a programação molecular para a invasão já está presente nas lesões pré-invasivas, antes do aparecimento das alterações morfológicas, capacitando as células epiteliais de uma lesão *in situ* a romperem as barreiras conferidas pela membrana basal e iniciaram o processo de invasão (CASTRO et al. 2008). Este trabalho prévio resultou em grupo de 147 genes, diferencialmente expressos entre DCIS puro e o

componente *in situ* do DCIS-IDC, revelando possíveis candidatos a marcadores de progressão do DCIS (CASTRO et al. 2008), os quais foram avaliados em maior profundidade no presente estudo.

Foram escolhidos 61 genes para validação por RT-qPCR, para os quais havia anticorpos comerciais disponíveis para uma etapa posterior de validação por IHQ, utilizando tecidos FFPE. Esta escolha é importante, especialmente para uma melhor avaliação de casos DCIS puro que podem ser exclusivamente utilizados para fins de diagnóstico, devido ao pequeno tamanho destas lesões, não sobrando, portanto, tecido neoplásico para fins de pesquisa. Este problema dificulta a identificação de biomarcadores para DCIS puro, pela falta de tecido congelado para análises de expressão avaliando o RNAm, considerando que há a necessidade de utilização de um grupo grande e independente de amostras nas etapas de validação. Além disso, a baixa qualidade do RNA obtido a partir de tecido FFPE pode introduzir erros na análise de expressão gênica, mesmo com os avanços nos protocolos para isolamento de RNA deste tipo de tecido e posterior análise transcricional (BENCHEKROUN et al. 2004; SARAIVA et al. 2006).

Entre os 61 genes escolhidos para a etapa de validação por RT-qPCR, utilizando o sistema *Taqman*, 32 apresentaram expressão concordante com os dados do experimento anterior de cDNA *microarray*. Entre estes 32 genes, 30 estão mais expressos no DCIS puro. Voltando aos dados do experimento de cDNA *microarray* (CASTRO et al. 2008), entre os 147 genes identificados como diferencialmente expressos entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC, 126 estão mais expressos em DCIS puro

enquanto apenas 21 no componente *in situ* do DCIS-IDC. Assim, foi sugerido que a transição de DCIS puro para o componente *in situ* do DCIS-IDC ocorre predominantemente pela redução de expressão gênica (CASTRO et al. 2008).

Outra validação por RT-qPCR, utilizando o sistema *SYBR green*, foi realizada para oito dos 61 candidatos escolhidos, resultando em quatro genes com resultados de expressão concordantes ao experimento de cDNA *microarray* (CASTRO et al. 2008). Com os resultados das duas validações, a próxima etapa foi a escolha dos candidatos a serem avaliados por IHQ em um grupo maior e independente de amostras. Foram escolhidos quatro marcadores com maior expressão no grupo DCIS puro (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19* e *CLTCL1*) e dois marcadores com maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC (*LOX* e *SULF1*).

ADFP, ou *PLIN2*, é um membro da família de proteínas PAT (*perilipin–adipophilin–TIP47*), a qual está envolvida no transporte e armazenamento de lipídeos em diversos tipos celulares (WOLINS et al. 2005). O *ADFP* humano está localizado no cromossomo 9 e codifica uma proteína de 437 aminoácidos (Adipose differentiation-related protein), associada à formação de gotículas de lipídeos em todos os tipos celulares que acumulam lipídeos de maneira normal ou anormal (CHANG e CHAN 2006). Há indícios de que *ADFP* possa ser um bom biomarcador para câncer renal (NOGUEIRA e KIM 2008; MORRISSEY et al. 2010). YAO et al. (2007) identificou *ADFP* como um marcador de bom prognóstico em câncer renal, com aumento de expressão associado a maiores taxas de sobrevida. No

nosso estudo, *ADFP* foi encontrado mais expresso em DCIS puro, a qual também é uma lesão de melhor prognóstico em DC.

ANAPC13 (*anaphase-promoting complex subunit 13*) está localizado no cromossomo 3, codifica uma proteína de 74 aminoácidos (YOON et al. 2002), e é uma das treze subunidades do complexo/ciclossomo promotor de anáfase (APC/C). O APC/C é uma grande ubiquitina ligase que controla a progressão do ciclo celular, através da ubiquitinação de importantes reguladores mitóticos tais como as ciclinas B, securinas e PILKI, e é essencial na transição da etapa de metáfase para a anáfase (PETERS 2002). Este complexo é responsável pela destruição da coesão entre cromátides irmãs, através da ativação de uma proteína chamada cisteína-protease-separase, possibilitando que o fuso mitótico separe as cromátides para polos opostos (NASMYTH 2001). A ativação deste complexo é dependente de duas proteínas, Cdc20 e Cdh1. APC/Cdc20 está envolvida principalmente com a regulação da progressão da mitose e sua ativação inicia a transição metáfase-anáfase (MUSACCHIO e SALMON 2007). Por outro lado, APC/Cdh1 também está envolvida em outros processos como controle diferenciação celular, estabilidade genômica e supressão de tumores (LI e ZHANG 2009; WÄSCH et al. 2010; QIAO et al. 2010). Assim, a disfunção de APC/Cdh1 pode levar ao desenvolvimento de doenças, tais como o câncer (WÄSCH et al. 2010). No nosso estudo, *ANAPC13* tem menor expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC. Assim, uma disfunção do complexo APC/C, pela perda de expressão de *ANAPC13*, pode estar associada à progressão em DCIS.

ARHGAP19 localiza-se no cromossomo 10, é um membro da família RhoGAP, reguladora da atividade das proteínas Rho GTPases, envolvidas em processos celulares como migração celular, proliferação, diferenciação, organização do citoesqueleto, controle da apoptose e tráfico intracelular (MOON e ZHENG 2003). No nosso estudo, foi encontrado menos expresso no componente *in situ* do DCIS-IDC. Recentemente, foi observado que *ARHGAP19* apresenta redução de expressão em linhagens celulares de leucemia humana (HL-60) expostas ao benzeno e seus metabólitos (SARMA et al. 2011).

CLTCL1 (*clathrin, heavy chain-like 1*) é um membro da família das clatrininas de cadeia pesadas que desempenham um importante papel no processo de endocitose (KEDRA et al. 1996; HOOD e ROYLE 2009) e na estabilização de fibras do fuso mitótico (ROYLE et al. 2005). Está localizado no cromossomo 22 e codifica uma proteína de 1640 aminoácidos, que apresenta alta expressão em tecidos musculares (LONG et al. 1996; LIU et al. 2001). A endocitose mediada por clatrininas é necessária para a internalização e posterior degradação de receptores, tais como o EGFR. Como já comentado, os receptores da família de crescimento epitelial desencadeiam sinais proliferativos e anti-apoptóticos. A internalização em vesículas endossomais e a degradação em lisossomos são mecanismos importantes para controlar a ativação do receptor EGFR (WILEY e BURKE 2001). Assim, as clatrininas tem um papel na atenuação das atividades de EGFR e no controle de vias de sinalização específicas (VIEIRA et al. 1996; HUANG et al. 2004). Portanto, a modulação da expressão de clatrininas

parece ter um papel na tumorigênese e na proliferação celular (PYRZYNSKA et al. 2009). No nosso estudo, há redução da expressão de *CLTCL1* no componente *in situ* do DCIS-IDC. Uma desregulação da função das clatrininas no processo de internalização de receptores celulares, tais como o EGFR, pode contribuir para o processo de progressão do DCIS. Ainda, há estudos reportando o envolvimento do gene *CLTCL1* em outros tipos de cânceres como meningiomas (MOCKER et al. 2011).

LOX (Lysyl Oxidase) está localizado no cromossomo 5 e codifica uma proteína de matrix extracelular, envolvida com a catalisação de ligações cruzadas entre colágenos e elastina. A formação de estruturas cruzadas entre colágeno e elastina leva a um aumento da força de tensão e da integridade estrutural da matrix extracelular, essencial para o funcionamento normal do tecido conjuntivo, desenvolvimento embrionário e remodelamento de tecidos em adultos (PAYNE et al. 2007). Estudos sugerem que o aumento de expressão de *LOX* está associado ao processo de progressão de câncer de mama (KIRSCHMANN et al. 1999). A maior expressão de *LOX* está correlacionada com doença metastática e é essencial no processo de metástase induzida por hipóxia em modelo de camundongo (ERLER e GIACCIA 2006) e promove migração em células MDA-MB-231 (LIANG et al. 2007). Nossos resultados corroboram com estes achados já que *LOX* apresenta aumento de expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC. Por outro lado, há evidências na literatura de que *LOX* tenha um efeito como supressor tumoral e que sua expressão esteja associada com inibição da cascata de sinalização ativada pela expressão de HER2 em câncer de

mama (MIN et al. 2007). Corroborando com estes dados, em um trabalho prévio do nosso grupo, foi observada associação entre aumento da expressão de *HER2* e diminuição de *LOX*, através de análise transcricional por sequenciamento de próxima geração, tanto em modelo celular como em casos IDC (CARRARO et al. 2011). Ainda, a associação entre a expressão de *LOX* e o *status* de *HER2* foi avaliada pelo nosso grupo no TMA1, composto por lesões *in situ*. Foi observada uma associação muito próxima da significância estatística entre a ausência de *LOX* e *status* positivo de *HER2* ($P=0,05$) (dados não mostrados).

Por último, *SULF1* localiza-se no cromossomo 8 e é um membro da família das endosulfatases, envolvidas com a remoção de grupos sulfato em proteoglicanos heparanos de sulfato, alterando o sítio de ligação de moléculas envolvidas com sinalização celular. ANDRÉ et al. (2009) e BRET et al. (2011) reportaram maior expressão de *SULF1* em tumores mamários quando comparados a lesões benignas e ao tecido normal, respectivamente. Ainda, *SULF1* foi encontrado mais expresso em lesões IDC em relação ao DCIS (NISHIDATE et al. 2004). Um estudo recente mostra que o silenciamento de outro membro da família das endosulfatases, *SULF2*, pode atenuar a transição de carcinoma ductal *in situ* para o carcinoma ductal invasivo *in vivo* (KHURANA et al. 2012). Assim, nossos resultados concordam com esses dados da literatura, já que *SULF1* apresentou maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC, que sinaliza progressão para a doença invasiva.

Os seis candidatos foram avaliados em um TMA, composto por lesões *in situ* puro e componente *in situ* do DCIS-IDC. ANAPC13 e CLTCL1 apresentaram maior expressão citoplasmática em DCIS puro e SULF1 apresentou maior expressão citoplasmática no componente *in situ* do DCIS-IDC, resultados concordantes com os dados de RNAm. Para ADFP, ARHGAP19 e LOX não foram encontradas associações estatisticamente significativas, o que sugere que regulações pós-traducionais podem estar ocorrendo para estas proteínas. Diferenças em nível de proteína entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC já foram reportadas em outros estudos (STEINMAN et al. 2007; MEIJNEN et al. 2008). ER, PR e EGFR foram encontrados mais expressos no DCIS puro em relação ao componente *in situ* do DCIS-IDC (STEINMAN et al. 2007; SCHORR et al. 2010). PARK et al. (2006) reportou que o *status* de amplificação de HER2 difere entre estas duas lesões. Estes dados reforçam a ideia de que há diferenças moleculares entre estas duas lesões de morfologia similar.

Na avaliação com características clinicopatológicas, disponíveis para as amostras analisadas deste TMA, a presença de ANAPC13 foi associada com status positivo de ER e PR, sugerindo que este possa ser um marcador de bom prognóstico em lesões DCIS puro. Apesar de não significativa, a presença de SULF1 foi observada em cinco das seis amostras do subtipo comedo-carcinoma presentes na nossa casuística ($P=0,07$). Com um aumento do número amostral, é possível que esta associação fosse observada dentro da significância estatística.

Foi então realizada uma avaliação preliminar do potencial de ANAPC13, CLTCL1 e SULF1 em prever invasão em DCIS, avaliando, por IHQ, o corte inteiro de amostras DCIS puro que apresentaram ou não um segundo evento (caracterizado como recidiva local e/ou progressão para doença invasiva e/ ou metastática) ao longo de pelo menos seis anos de seguimento. Foram utilizadas três diferentes abordagens para a análise dos dados de IHQ, considerando maior intensidade de marcação, considerando a marcação mais frequente (em porcentagem) e uma avaliação combinada de intensidade e porcentagem de marcação. Não foram encontrados resultados com significância estatística. Entretanto, foi observada maior presença de ANAPC13 em amostras DCIS sem segundo evento na análise combinada de intensidade e porcentagem de marcação, e menor positividade de SULF1 em amostras DCIS sem segundo evento nas outras duas abordagens utilizadas. Estes resultados são condizentes com os dados encontrados na análise do TMA com lesões *in situ*. Ainda, sugerem que a adoção de diferentes abordagens para análise dos dados de IHQ, em cortes inteiros da neoplasia, pode auxiliar na escolha da melhor forma de avaliação de cada um dos marcadores, com base nos resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC, previamente analisados em TMA. É importante mencionar que nosso estudo utilizou uma baixa casuística de amostras DCIS puro com segundo evento, a qual estava disponível no momento de realização desta etapa. Com um aumento desta casuística, é possível que associações com significância estatística tivessem sido observadas para ANAPC13 e SULF1.

A expressão dos três marcadores foi então avaliada ao longo da progressão do DC. *CLTCL1* apresenta expressão reduzida nos estágios mais iniciais da progressão, quando as células ainda exibem um fenótipo pré-invasivo, porém não há diferenças de expressão em estágios mais tardios deste processo. Este resultado enfatiza o potencial deste gene como candidato a biomarcador de predição de progressão de lesões pré-invasivas. Porém, como já foi mencionado, é necessário um número maior de amostras DCIS com segundo evento para uma melhor avaliação dos marcadores. *SULF1* apresentou aumento de expressão nos estágios iniciais da progressão. Não foram vistas diferenças de expressão em estágios mais tardios em análise por RNAm, porém uma redução significativa foi observada na análise proteica. Para *ANAPC13*, foi verificada uma queda da expressão tanto em nível de RNAm quando de proteína ao longo da progressão do DC. Estes resultados sugerem que a redução da expressão de *ANAPC13* não está envolvida apenas nos estágios iniciais que precedem as manifestações morfológicas de invasão, mas também em estágios mais tardios ao longo da progressão. Por outro lado, a queda e o aumento de expressão de *CLTCL1* e *SULF1*, respectivamente, parecem ser eventos pontuais que antecedem a manifestação do fenótipo invasivo. Além disso, a queda de expressão de *SULF1* em IDC, verificada em nível de proteína, pode também desempenhar um papel importante em etapas mais tardias da progressão da doença. Há estudos demonstrando que a expressão de *SULF1* é muito baixa ou ausente em linhagens celulares metastáticas de mama. A falta de *SULF1* estaria envolvida com aumento migração (KHURANA et al. 2011) e da angiogênese

(NARITA et al. 2006). Ainda, no nosso estudo, a presença de SULF1 foi associada com características de bom prognóstico em IDC, como menor número de linfonodos comprometidos, *status* positivo de PR e grau I de SBR, o que reforça a ideia de que a positividade da proteína SULF1 possa ser um fator favorável em tumores invasivos de mama.

Na sequência, foi investigada a associação da expressão citoplasmática destes três marcadores com a probabilidade de sobrevida global e livre de doença em IDC. A positividade de ANAPC13 foi associada com maior probabilidade de sobrevida global e livre de doença em IDC. O modelo de regressão de COX indicou que a presença de marcação citoplasmática de ANAPC13 pode ser um fator protetor em IDC. Assim, avaliamos a associação da expressão desta proteína com os subtipos da classificação molecular do IDC. Amostras classificadas como luminal A, com positividade de ANAPC13, apresentaram maior taxa de sobrevida global e menor número de linfonodos comprometidos. Apesar de serem considerados como de melhor prognóstico, casos classificados como luminal A são muito heterogêneos, apresentando diferentes evoluções clínicas. Desta forma, é de grande importância, a descoberta de novos marcadores moleculares que possam melhorar a estratificação destes tumores, permitindo um tratamento mais individualizado e mais eficiente (LOI 2008; DI COSIMO e BASELGA 2010). Neste contexto, ANAPC13 pode desempenhar um papel importante na subclassificação de casos Luminais A. Por último, foi observada associação entre a marcação positiva de ANAPC13 e maior probabilidade de sobrevida global em pacientes com grau 2 e 3 de SBR (Anexo 5).

Devido aos importantes resultados obtidos para *ANAPC13*, resolvemos estudar este gene em maior profundidade. Apesar da grande informação disponível a respeito do APC/C, pouco se sabe a respeito das subunidades que fazem parte deste complexo. A décima terceira subunidade do complexo APC/C foi primeiramente descrita em leveduras e conhecida como (Swm1) (HALL et al. 2003), ou ANAPC13/APC13 em humanos, sendo uma proteína extremamente conservada entre as espécies. SCHWICKART et al. (2004) demonstraram que Swm1/APC13 promove a ligação estável de outras duas subunidades, Cdc16 (ANAPC6) e Cdc27 (ANAPC3) ao APC/C, sendo, portanto, essencial para o bom funcionamento do complexo. Em humanos, acredita-se que 12 das 13 unidades já descritas estejam presentes, com uma super-representação das unidades 3,7 e 8 (DUBE et al. 2005).

Primeiramente, avaliamos possíveis eventos envolvidos com a redução de expressão de *ANAPC13* ao longo da progressão do DC. Esta redução não parece ser devida a proteínas truncadas, geradas por mutações que levem a um códon de parada prematuro da proteína porque nenhuma alteração foi encontrada na região codificante deste gene. Também não foi encontrada deleção da região cromossômica, onde está mapeado o gene *ANAPC13*. Em relação ao mecanismo de metilação do promotor, foi verificada uma reativação da expressão de *ANAPC13* na linhagem MCF-7 tratada em relação a não tratada (Mock) com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina, o que é um indício de que a modulação da expressão deste gene possa estar sofrendo influência de regulação epigenética por metilação

do DNA. No entanto, é necessária uma investigação mais profunda para averiguar se este mecanismo está, pelo menos em parte, envolvido com a regulação da expressão de *ANAPC13*. Ainda, outros mecanismos regulatórios, como a ação de microRNAs, podem estar envolvidos na redução dos níveis de RNAm e proteína e merecem serem avaliados no futuro.

Pelo fato do complexo APC/C ser responsável pela separação das cromátides irmãs durante a transição metáfase-anáfase, resolvemos investigar se havia relação entre a menor expressão de *ANAPC13* e aumento de instabilidade genômica em IDC. Uma associação estatisticamente significativa foi observada entre menor expressão de *ANAPC13* e maior número de CNAs. O maior número de ganhos em amostras com menor expressão de *ANAPC13* foi observado nos cromossomos 1 (1q23.1-1q32.1), 8 e 17 (17q24.2). Interessantemente, estas são regiões conhecidas por apresentarem grande instabilidade genética em tumores de mama (BERGAMASCHI et al. 2006). Ainda, tumores triplo-negativos podem apresentar maior número de CNAs, especialmente o subtipo basal (BERGAMASCHI et al. 2006; HU et al. 2009). No entanto, não foi observada super-representação de nenhum dos subtipos moleculares da classificação do IDC na nossa casuística, que pudesse trazer viés aos nossos resultados, o que reforça a ideia de que a menor expressão de *ANAPC13* pode estar associada a um aumento de instabilidade genômica em tumores mamários invasivos.

Para melhor caracterizar o gene *ANAPC13*, verificamos se as três variantes de *splicing* alternativo, descritas até o momento para este gene, estavam presentes em linhagens normais e tumorais de mama assim como em amostras IDC. As três variantes foram encontradas nas amostras analisadas, porém com um nível de expressão variável. Um próximo passo poderia ser a investigação da associação da expressão destas variantes com características clinico-patológicas em IDC e ainda verificar o balanço de expressão entre as variantes em amostras normais e tumorais de mama. Em estudos prévios, nosso grupo identificou variantes de *splicing* alternativo, diferencialmente expressas entre linhagens normais e tumorais de mama (FERREIRA et al. 2010b; CARRARO et al. 2011). A identificação de variantes de *splicing* associadas ao câncer de mama é importante e pode contribuir para um melhor entendimento da biologia desta doença. Além disso, há possibilidades de aplicação de variantes identificadas como marcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico (FERREIRA et al. 2007).

A próxima etapa foi a avaliação preliminar do papel funcional de *ANAPC13*. Para isso, verificamos o efeito da superexpressão e do silenciamento deste gene na linhagem tumoral de mama MCF-7, transfectada com sequências senso e anti-senso, respectivamente, através de um ensaio de proliferação *in vitro* em tempo real. A linhagem com superexpressão de *ANAPC13* apresentou maior índice proliferativo, enquanto que a linhagem com silenciamento de *ANAPC13* teve índice menor de proliferação em relação aos controles sem transfecção e

transfectado com o vetor vazio. Maior expressão de *ANAPC13* não deve ser um evento importante na progressão do DCIS. Ao contrário, a diminuição de expressão de *ANAPC13* juntamente com menor índice proliferativo pode estar associada à migração e à invasão. Há indícios na literatura que sugerem que células infiltrativas apresentam redução na taxa de proliferação (SVENSSON et al. 2003, GIESE et al. 2003). Isso poderia explicar o menor índice proliferativo, observado para a linhagem Sil-*ANAPC13*. Ensaio funcionais para avaliar migração e invasão devem ser realizados. Por outro lado, em momentos de alta proliferação celular, como nas etapas iniciais do surgimento do tumor, maior expressão de *ANAPC13* deve ser importante. Isso foi verificado no nosso estudo, já que *ANAPC13* está mais expresso em células DCIS puro quando comparado a células não-neoplásicas (bordas de fibroadenoma). Um fenômeno interessante observado para quase todos os marcadores avaliados neste trabalho foi um aumento de expressão entre células não-neoplásicas e DCIS puro, seguida de diminuição de expressão entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC (anexo 4), sugerindo que a tumorigênese seja marcada por um aumento de expressão gênica, enquanto que na progressão é predominantemente observada uma redução desta expressão.

Por fim, verificamos quais genes seriam modulados pela superexpressão e/ou silenciamento de *ANAPC13*, avaliando as linhagens MCF-7 transfectadas com sequências senso e anti-senso pela técnica de cDNA *microarray*. Os dados encontrados sugerem que a superexpressão e/ou silenciamento de *ANAPC13* modulam a expressão de genes envolvidos

com o ciclo celular, o que é muito interessante, já que *ANAPC13* está intimamente associado a este processo. Uma análise mais detalhada deste grupo de genes pode trazer informações importantes a respeito da biologia da progressão do DC.

Os resultados deste estudo sugerem que a investigação das diferenças moleculares entre células epiteliais de DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-DC, as quais são eventos anteriores à manifestação das alterações morfológicas da invasão, pode resultar na identificação de novos marcadores moleculares e também de genes que exerçam um papel biológico importante na progressão do DCIS. Além disso, estes marcadores podem ter aplicação na rotina clínica e auxiliar na predição do risco de progressão tanto de lesões DCIS puro quanto de lesões IDC em estágios iniciais. Uma melhor estratificação dos casos implicará em escolhas de tratamento mais adequadas, o que poderá aumentar a sobrevida das pacientes.

Nosso estudo identificou genes, possivelmente envolvidos com a progressão do DC, com destaque para o gene *ANAPC13*, um forte candidato a marcador molecular em DC (SENS-ABUÁZAR et al. 2012) (Anexo 7). Uma investigação mais profunda do papel funcional de *ANAPC13* no contexto de câncer de mama, especialmente da sua relação com instabilidade genômica, pode contribuir para um maior entendimento dos mecanismos associados com a progressão do DC.

6 CONCLUSÃO

1. Esse trabalho confirmou a diferença de expressão de um grupo de genes entre células epiteliais do DCIS puro e do componente *in situ* do DCIS-IDC. A maior parte destes genes apresentou maior expressão em células epiteliais do DCIS puro reforçando a ideia de que a transição do DCIS puro para o componente *in situ* do DCIS-IDC seja marcada predominantemente por redução da expressão gênica.
2. A expressão citoplasmática de ANAPC13 e CLTCL1 apresentou maior frequência de positividade da marcação em lesões DCIS puro enquanto que o oposto foi visto para SULF1, confirmando os dados obtidos na análise de RNAm em um grupo independente de amostras.
3. Foram identificados dois genes (*ANAPC13* e *SULF1*), cujas proteínas apresentaram potencial de predição de invasão em DCIS puro observado pela alteração da expressão (*ANAPC13* – maior expressão; *SULF1* – menor expressão). Na avaliação do potencial prognóstico dessas proteínas em lesões invasivas, a presença de *SULF1* esteve associada a características clinico-patológicas de melhor prognóstico. Para *ANAPC13*, a presença da proteína foi associada à mais alta probabilidade de sobrevida global e livre de doença.

4. A análise funcional mostrou que o aumento e diminuição no nível de expressão de *ANAPC13* estão associados a maiores e menores índices de proliferação celular, respectivamente. A redução da expressão transcricional de *ANAPC13* pode ter um papel importante na aquisição do fenótipo invasivo, uma vez que menor expressão foi associado com maior instabilidade genômica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol** 1998; 11:155-68.

Allred DC, Wu Y, Mao S, et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. **Clin Cancer Res** 2008; 14:370-8.

Amari M, Moriya T, Ishida T, et al. Loss of heterozygosity analyses of asynchronous lesions of ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the human breast. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33:556-62.

André F, Michiels S, Dessen P, et al. Exonic expression profiling of breast cancer and benign lesions: a retrospective analysis. **Lancet Oncol** 2009; 10:381-90.

Bacus SS, Gudkov AV, Esteva FJ, Yarden Y. Expression of erb-B receptors and their ligands in breast cancer: implications to biological behavior and therapeutic response. **Breast Dis** 2000; 11:63-75.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Pro-gestosterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **J Clin Oncol** 2003; 21:1973-9.

Benckroun M, DeGraw J, Gao J, et al. Impact of fixative on recovery of mRNA from paraffin-embedded tissue. **Diagn Mol Pathol** 2004; 13:116-25.

Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:1033-40.

Bindra RS, Glazer PM. Genetic instability and the tumor micro-environment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. **Mutat Res** 2005; 569:75-85.

Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. **J Pathol** 2011; 223:307-17.

Brasky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2005; 10:249-60.

Bret C, Moreaux J, Schved JF, Hose D, Klein B. SULFs in human neoplasia: implication as progression and prognosis factors. **J Transl Med** 2011; 21:9:72.

Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. **N Engl J Med** 2004; 350:1430-41.

Cancer Research UK. **Invasive ductal breast cancer**. Available from: <URL:<http://cancerhelp.cancerresearchuk.org/type/breast-cancer/about/type/invasive-ductal-breast-cancer>> [2012 jun 12]

Carraro DM, Ferreira EN, de Campos Molina G, et al. Poly (A)+ transcriptome assessment of ERBB2-induced alterations in breast cell lines. **PLoS One** 2011; 6:e21022.

Castro NP, Osorio CA, Torres C, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R87.

Chang BH, Chan L. Regulation of Triglyceride Metabolism. III. Emerging role of lipid droplet protein ADFP in health and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2006; 292:G1465-8.

Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1368-76.

Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:303-13.

Clark SE, Warwick J, Carpenter R, Bowen RL, Duffy SW, Jones JL. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. **Br J Cancer** 2011; 104:120-7.

Colot V, Rossignol JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. **Bioessays** 1999; 21:402-11.

Come SE, Buzdar AU, Arteaga CL, et al. Second international conference on recent advances and future directions in endocrine manipulation of breast cancer: summary consensus statement. **Clin Cancer Res** 2003; 9:443S-6S.

Conforti-Froes NDT, Rossit A. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. **Rev Soc Bras Cancerol** 2000; 10 26-31.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature** 2012; 486:346-52.

Delaney G, Ung O, Bilous M, Cahill S, Greenberg ML, Boyages J. Ductal carcinoma in situ. Part I: definition and diagnosis. **Aust NZ J Surg** 1997; 67:81-93.

Di Cosimo S, Baselga J. Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. **Nat Rev Clin Oncol** 2010; 7:139-47.

DiGiovanna MP, Chu P, Davison TL, et al. Active signaling by HER-2/neu in a subpopulation of HER-2/neu-overexpressing ductal carcinoma in situ: clinicopathological correlates. **Cancer Res** 2002; 62:6667-73.

Dube P, Herzog F, Gieffers C et al. Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. **Mol Cell** 2005; 20:867-79.

Eisenberg ALM, Koifman S. Câncer de Mama : Marcadores Tumorais. **Ver Bras Cancerol** 2001; 47:377-88.

Erbas B, Provenzano E, Armes J, Gertig D. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 97:135-44.

Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. **Cancer Res** 2006; 66:10238-41.

Ernster VL, Barclay J. Increases in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast in relation to mammography: a dilemma. **J Natl Cancer Inst Monogr** 1997; (22):151-6.

Espina V, Liotta LA. What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? **Nat Rev Cancer** 2011; 11:68-75.

Faverly DR, Burgers L, Bult P, Holland R. Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications. **Semin Diagn Pathol** 1994; 11:193-8.

Ferreira EN, Galante PA, Carraro DM, de Souza SJ. Alternative splicing: a bioinformatics perspective. **Mol Biosyst** 2007; 3:473-7.

Ferreira EN, Maschietto M, Silva SD, Brentani H, Carraro DM. Evaluation of quantitative rt-PCR using nonamplified and amplified RNA. **Diagn Mol Pathol** 2010a; 19:45-53.

Ferreira EN, Rangel MC, Galante PF, et al. Alternative splicing enriched cDNA libraries identify breast cancer-associated transcripts. **BMC Genomics** 2010b; 11:S4.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:453-8.

Fisher B, Land S, Mamounas E, Dignam J, Fisher ER, Wolmark N. Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. **Semin Oncol** 2001; 28:400-18.

Frye CA. An overview of oral contraceptives: mechanism of action and clinical use. **Neurology** 2006 Mar 28;66.

Gage M, Wattendorf D, Henry LR. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. **J Surg Oncol** 2012; 105:444-51.

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. **J Clin Oncol** 2003; 21:1624-36.

Gonzalez ME, Peterson EA, Privette LM, Loffreda-Wren JL, Kalikin LM, Petty EM. High SEPT9_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. **Cancer Res** 2007; 67:8554-64.

Hall MC, Torres MP, Schroeder GK, Borchers CH. Mnd2 and Swm1 are core subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* anaphase-promoting complex. **J Biol Chem** 2003; 278:16698-705.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:e48-72.

Hannemann J, Velds A, Halfwerk JB, Kreike B, Peterse JL, van de Vijver MJ. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. **Breast Cancer Res** 2006; 8:R61.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:5287-312.

Hill AD, Doyle JM, McDermott EW, O'Higgins NJ. Hereditary breast cancer. **Br J Surg** 1997; 84:1334-9.

Hood FE, Royle SJ. Functional equivalence of the clathrin heavy chains CHC17 and CHC22 in endocytosis and mitosis. **J Cell Sci** 2009; 122(Pt 13):2185-90.

Hu M, Yao J, Carroll DK, et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. **Cancer Cell** 2008; 13:394-406.

Hu X, Stern HM, Ge L, et al. Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. **Mol Cancer Res** 2009; 7:511-22.

Huang F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. **J Biol Chem** 2004; 279:16657-61.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Hynes NE, Macdonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Current Opinion in Cell Biology** 2009; 21:1-8.

Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1980-9.

Kao J, Salari K, Bocanegra M, et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **Plos One** 2009; 4:e6146.

Kedra D, Peyrard M, Fransson I, et al. Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. **Hum Mol Genet** 1996; 5:625-31.

Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. **Am J Pathol** 2010; 176:2911-20.

Khurana A, Liu P, Mellone P, et al. HSulf-1 modulates FGF2- and hypoxia-mediated migration and invasion of breast cancer cells. **Cancer Res** 2011; 71:2152-61.

Khurana A, McKean H, Kim H, et al. Silencing of HSulf-2 expression in MCF10DCIS.com cells attenuate ductal carcinoma in situ progression to invasive ductal carcinoma in vivo. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R43.

Kirschmann DA, Seftor EA, Nieva DR, Mariano EA, Hendrix MJ. Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 1999; 55:127-36.

Kuerer HM, Albarracin CT, Yang WT, et al. Ductal carcinoma in situ: state of the science and roadmap to advance the field. **J Clin Oncol** 2009; 27:279-88.

Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol** 2012; 13:e95-e102.

Leonard GD, Swain SM. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:906-20.

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics** 2002; 11:1427-31.

Li M, Zhang P. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. **Cell Div** 2009; 4:2.

Liang M, Zhang P, Fu J. Up-regulation of LOX-1 expression by TNF-alpha promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. **Cancer Lett** 2007; 258:31-7.

Liu SH, Towler MC, Chen E, et al. A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. **EMBO J** 2001; 20:272-84.

Livasy CA, Perou CM, Karaca G, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. **Hum Pathol** 2007; 38:197-204.

Loi S. Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers: what have we learnt? **Eur J Cancer** 2008; 44:2813-8.

Long KR, Trofatter JA, Ramesh V, McCormick MK, Buckler AJ. Cloning and characterization of a novel human clathrin heavy chain gene (CLTCL). **Genomics** 1996; 35:466-72.

Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:5974-9.

Marchbanks PA, Curtis KM, Mandel MG, Wilson HG, Jeng G, Folger SG, McDonaldJA, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Wingo PA, Simon MS, Norman SA, Strom BL, Ursin G, Weiss LK, Burkman RT, Spirtas R. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. **Contraception** 2012; 85:342-50.

Martins LAM. **Definição dos dinucleotídeos CpG metilados no promotor do gene PLCG2 e de sua influência na repressão transcricional em tumor de Wilms**. São Paulo; 2011 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:961-7.

Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Arch** 2005; 447:688-94.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ** 2000; 9;321:624-8.

Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers E, Vijver MJ. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. **Br J Cancer** 2008; 98:137-42.

Millis RR, Bobrow LG, Barnes DM. Immunohistochemical evaluation of biologic markers in mammary carcinoma in situ: correlation with morphological features and recently proposed schemes for histological classification. **Breast** 1996; 5:113-22.

Min C, Kirsch KH, Zhao Y, et al. The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. **Cancer Res** 2007; 67:1105-12.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mocker K, Holland H, Ahnert P, et al. Multiple meningioma with different grades of malignancy: case report with genetic analysis applying single-nucleotide polymorphism array and classical cytogenetics. **Pathol Res Pract** 2011; 207:67-72.

Molina R, Barak V, van Dalen A, et al. Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers recommendations. **Tumour Biol** 2005; 26:281-93.

Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. **Trends Cell Biol** 2003; 13:13-22.

Morrissey JJ, London AN, Luo J, Kharasch ED. Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer. **Mayo Clin Proc** 2010; 85:413-21.

Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:379-93.

Narita K, Staub J, Chien J, et al. HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo. **Cancer Res** 2006; 66:6025-32.

Nasmyth K. A prize for proliferation. **Cell** 2001; 107:689-701.

Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. **Cancer** 2003; 98:413-23.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5367-74.

Nishidate T, Katagiri T, Lin ML, et al. Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. **Int J Oncol** 2004; 25:797-819.

Nogueira M, Kim HL. Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2008; 26:113-24.

Oliveira MMC, Torresan C, de Oliveira SFV, et al. Epidemiologia do câncer de mama em pacientes do Sul do Brasil. **Bol Epidemiol Paulista (Online)** 2009; 6:4-14.

Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 51:227-38.

Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:2817-26.

Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. HER2 status in pure ductal carcinoma *in situ* and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. **Histopathology** 2006; 48:702-7.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer** 2001; 37:8:54-66.

Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer-a prospect. **J Cell Biochem** 2007; 101:1338-54.

Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 52:65-77.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature** 2000; 406:747-52.

Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. **Mol Cell** 2002; 9:931-43.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001;29:e45.

Piccart-Gebhart MJ. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn. **Eur J Cancer** 2006; 42:1715-9.

Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. **Crit Rev Oncol Hematol** 2004; 51:55-67.

Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2005; 10:231-47.

Portal de Oncologia Português. **O que é o cancro da mama?**. Disponível em: <URL:<http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/o-cancro-da-mama.html>> [2012 jun 12].

Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. **Mol Cancer Res** 2003; 1:362-75.

Pyrzynska B, Pilecka I, Miaczynska M. Endocytic proteins in the regulation of nuclear signaling, transcription and tumorigenesis. **Mol Oncol** 2009; 3:321-38.

Qiao X, Zhang L, Gamper AM, Fujita T, Wan Y. APC/C-Cdh1: from cell cycle to cellular differentiation and genomic integrity. **Cell Cycle** 2010; 9:3904-12.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res** 2010; 12:207.

Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. **Nature** 2005; 434:1152-7.

Saraiva TF, Castro NP, Pineda PHB, et al. Effects of oligo dT-T7 RNA primer in RNA amplification from paraffin-embedded tissue for microarray experiments. **Appl Cancer Res** 2006; 26:14-20.

Sarma SN, Kim YJ, Ryu JC. Differential gene expression profiles of human leukemia cell lines exposed to benzene and its metabolites. **Environ Toxicol Pharmacol** 2011; 32:285-95.

Schnitt SJ. Normal anatomy and development. In: Hayes DF, editor. **Atlas of breast cancer**. London: Mosby; 1995a. p.3.2-3.4.

Schnitt SJ. Pathology of breast cancer. In: Hayes DF, editor. **Atlas of breast cancer**. London: Mosby; 1995b. p.8.1-8.11.

Schorr MC, Pedrini JL, Savaris RF, Zettler CG. Are the pure in situ breast ductal carcinomas and those associated with invasive carcinoma the same? **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2010; 18:51-4.

Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, et al. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. **Cancer Res** 2006; 66:5278-86.

Schwartz GF. Consensus conference on the classification of ductal carcinoma in situ: the current treatment of ductal carcinoma in situ. **Breast J** 2001;7:308–10.

Schwickart M, Havlis J, Habermann B, et al. Swm1/Apc13 is an evolutionarily conserved subunit of the anaphase-promoting complex stabilizing the association of Cdc16 and Cdc27. **Mol Cell Biol** 2004; 24:3562-76.

Sens-Abuázar C, Napolitano E, Ferreira E, Osório CA, et al. Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: early events in the progression of preinvasive ductal carcinoma of the breast. **Transl Oncol** 2012; 5:113-23.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. **Cell** 1998; 95:927-37.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science** 1989; 244:707-12.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM classificação dos tumores malignos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Tumores de mama; p.137-148.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10869-74.

Spector NL, Xia W, Bums III H, et al. Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. **J Clin Oncol** 2005; 23:2502-12.

Steinman S, Wang J, Bourne P, Yang Q, Tang P. Expression of cytokeratin markers, ER-alpha, PR, HER-2/neu, and EGFR in pure ductal carcinoma in situ (DCIS) and DCIS with co-existing invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast. **Ann Clin Lab Sci** 2007; 37:127-34.

Stuart K, Boyages J, Brennan M, Ung O. Ductal carcinoma in situ management update. **Aust Fam Physician** 2005; 34:949-54.

Svensson S, Nilsson K, Ringberg A, Landberg G. Invade or proliferate? Two contrasting events in malignant behavior governed by p16(INK4a) and an intact Rb pathway illustrated by a model system of basal cell carcinoma. **Cancer Res** 2003; 63:1737-42.

Taneja P, Maglic D, Kai F, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clin Med Insights Oncol** 2010; 4:15-34.

Tewari M, Pradhan S, Singh U, Shukla HS. Estrogen and progesterone receptor status in breast cancer: effect of oral contraceptive pills and hormone replacement therapy. *Breast* 2007;5:540-5.

Tiezzi DG. Epidemiologia do câncer de mama. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2009; 31:213-5.

Tse GM, Tan PH. Diagnosing breast lesions by fine needle aspiration cytology or core biopsy: which is better? **Breast Cancer Res Treat** 2010; 123:1-8.

Van't Veer L, Dai H, Van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415: 530-36.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. **Science** 1996; 274:2086-9.

Vogel VG. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. **Menopause** 2008; 15(4 Suppl):782-9.

Vos CB, Ter Haar NT, Rosenberg C, et al. Genetic alterations on chromosome 16 and 17 are important features of ductal carcinoma in situ of the breast and are associated with histologic type. **Br J Cancer** 1999; 81:1410-8.

Warnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. **Br J Cancer** 2001; 85:869-74.

Wäsch R, Robbins JA, Cross FR. The emerging role of APC/CCdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. **Oncogene** 2010; 29:1-10.

Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. **J Natl Cancer Inst** 1973; 50:1111-8.

Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. **J Natl Cancer Inst** 1975; 55:231-73.

Wiley HS, Burke PM. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. **Traffic** 2001; 2:12-8.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:118-45.

Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bickel PE. S3-12, adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. **J Biol Chem** 2005; 280:19146–55.

Yao M, Huang Y, Shioi K, et al. Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. **Clin Cancer Res** 2007; 13:152-60.

Yoon HJ, Feoktistova A, Wolfe BA, Jennings JL, Link AJ, Gould KL. Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. **Curr Biol** 2002; 12:2048-54.

Zhuang Z, Merino MJ, Chuaqui R, Liotta LA, Emmert-Buck MR. Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. **Cancer Res** 1995; 55:467-71.

Anexo 1 - Protocolo de Amplificação de RNA mensageiro

Baseado em GOMES et al. 2003. Modificado.

Primeiro round de amplificação

Síntese da primeira fita de cDNA:

Tubo de PCR 0,2 ml

Reação:

1,5 µg RNA total eluído

1 µl de 0,3 ug/ul oligo dT(24)*-T7
primer(2µl de 0,1 ug/ul)

Termo- Incubar 70 °C por 10 minutos -
4°C ∞

Mix para reação da 1a. fita de cDNA:

4 µl 5x *First strand buffer*

2 µl 0,1 M DTT

2 µl 10mM dNTP

1 µl Rnase IN

1 µl Superscript II

Spin

Termo- Incubar a 42°C por 2 horas - 4°C
∞

Síntese da 2a. fita de cDNA:

Reação:

20 µl cDNA (primeira fita)

20 µl Second strand buffer 5X

1 µl 10mM dNTP

1 µl E.coli DNA ligase

4 µl E. coli DNA polimerase I

1 µl RNase H

53 µl água tratada com DEPC

Volume total: 100µl

Incubar: à 16°C por 2 horas (direto no
gelo)

Adicionar 2 µl de T4 DNA polimerase I

Incubar : à 16°C por 5 min

Gelo

Parar a reação:

10 µl de 0,5M EDTA pH 8,0

Purificação com Fenol:Clorofórmio:

Álcool isoamílico

Adicionar 100µl de
Fenol:Clorofórmio:Isoamilico (25:24:1) pH
8.0 – tubos de 1,5 ml

Inverter (1 min) + 2 min descansando na
bancada

Centrifugar por 10 min a 14000 rpm
(temp. ambiente)

Cuidadosamente retirar a fase aquosa
Dispensar em um tubo novo
Adicionar 100µl de Clorofórmio
Inverter
Centrifugar por 10 min a 14000 rpm
(temperatura ambiente)
Cuidadosamente retirar fase aquosa e
dispensar em um tubo novo.
Ao clorofórmio, acrescentar +/- 85µl de
H₂O-DEPC e centrifugar por 10 min a
14000 rpm (temperatura ambiente).
Cuidadosamente retirar fase aquosa.
Dispensar em um tubo novo.

Precipitação

Adicionar 80 µl de 3M Na₂OAc pH 5.2 ou
0,5 do volume de NH₄Oac 7,5Mm (85 µl
de NH₄OAc)
Adicionar 750µl de etanol absoluto (-20C)
– 3x do volume recuperado
1 µl de acrilamida (5mg/mL)
Inverter
Incubar a -80°C por 20-30 min ou -20°C
overnight
Centrifugar a 14000 rpm a 4°C por 20min
Remover com a pipeta o sobrenadante e
guardar o 1º descarte -20°C
Lavar 4x o *pellet* com 1ml etanol 70%
DEPC (-20°C)

Centrifugar a 14000 rpm, a 4°C por 2min
Secar a 37°C ou 42°C até evaporar o
etanol
Diluir em 12 µl H₂O/DEPC – mexer bem
com a pipeta (10 µl transcrição, 2 µl
guardar)
Colocar em banho-maria a 55°C por 10
min

Transcrição *in vitro*

10µl dscDNA (entrar com máximo de
20µg de cDNA)

Reação:

7,5µl of 25mM rNTP (A,G,C and UTP,
prepare apenas o necessário para a
reação) (7,5x N tubos/4)

5 µl 5x *reaction buffer*

2,5 µl *enzyme mix (Rnase inhibitor and
T7 phage polymerase)*

Incubar a 37°C por 5 hs.

Purificação do RNA usando Trizol

(centrifuga refrigerada a 4°C e ETOH a -
20°C)

Adicionar 25 µl de água/DEPC à reação

Descongelar a reação no gelo

Adicionar 1ml of Trizol em cada tubo –
tubos de 1,5 ml

Inverter 2 min

Incubar a temperatura ambiente por 3 min
Adicionar 200 µl clorofórmio por 1 ml de
solução de Trizol. Inverter.

Incubar a temperatura ambiente por 3
minutos.

Centrifugar 12.000g por 15 minutos a 4°C
Transferir a fase aquosa (~ 600µl) para
um novo tubo e adicionar isopropanol na
proporção de 1:1 em relação à fase
aquosa (não retirar muito da fase aquosa)

Adicionar: ~ 600µl de isopropanol

60 µl de NaAc (10%) (3 M)

0,5 µl de glicogênio

(20mg/mL)

Inverter

Incubar a temperatura ambiente por 20-
30 minutos.

Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos.

Reservar isopropanol.

Lavar o pellet 4X com 1 ml de solução

70% ETOH preparado com água DEPC

Centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos.

Secar o pellet a 37-42°C

Ressuspender em 6 µl de água DEPC –
mexer bem com a pipeta

Colocar em banho-maria a 55°C por 10
min

Segundo round de amplificação (fase exponencial)

Síntese da 1a. fita de cDNA:

Amostra em 6 µl.

Adicionar 3µl (3ug/ul) *random hexamer*
(ex: dN6).

Termo- Incubar 70 °C por 10 minutos

Deixar na bancada - 10 minutos

Reação:

4 µl 5x *First strand buffer*

2 µl 0,1M DTT

2 µl 10mM dNTP

1 µl Rnase IN

1 µl Superscript II (SS II)

Termo- Incubar a 42°C por 2 horas - 4°C

∞

Síntese da 2a. fita de cDNA

Reação:

20 µl de cDNA (reação)

10 µl *Advantage buffer* (10x cDNA PCR
reaction buffer)

2 µl 10mM dNTP

1,0 µl de 0,3 ug/ul oligo dT(15)**-T7
primer

0,7 µl RNase H

2 µl Advantage Polymerase
64,3 µl água tratada com DEPC
Incubar à 37°C por 10 min para digestão do RNA
94°C por 3 min para denaturação
65°C por 5 min para a ligação dos primers
75°C por 30 min para extensão
Parar a reação com solução de 5µl 1M NaOH 2mM EDTA.
Incubar a 65°C por 10 minutos para inativação enzimática

Purificação com Fenol: Clorofórmio : Álcool isoamílico

Adicionar 100ul de Fenol:Clorofórmio:Isoamilico (25:24:1) pH 8.0
Inverter (1 min) + 2 min descansando na bancada
Centrifugar por 10 min a 14000 rpm (temperatura ambiente)
Cuidadosamente retirar fase aquosa
Dispensar em um tubo novo
Adicionar 100µl de Clorofórmio
Inverter
Centrifugar por 10 min a 14000 rpm (temperatura ambiente)

Cuidadosamente retirar fase aquosa e dispensar em um tubo novo.

Ao clorofórmio, acrescentar +/- 85µl de H₂O-DEPC e centrifugar por 10 min a 14000 rpm (temperatura ambiente).
Cuidadosamente retirar fase aquosa.
Dispensar em um tubo novo.

Precipitação

Adicionar 80 µl de 3M Na₂OAc pH 5.2 ou 0,5 do volume de NH₄Oac 7,5mM (85 µl de NH₄OAc)

Adicionar 750 µl de etanol absoluto (-20C) – 3x do volume recuperado

1 µl de acrilamida (5mg/mL)

Inverter

Incubar a -80°C por 20-30 min

Centrifugar a 14000 rpm a 4°C por 30min

Remover com a pipeta o sobrenadante e reservar

Lavar 4x o *pellet* com 1ml de etanol 70% (-20C)

Centrifugar a 14000 rpm, a 4°C por 2min

Secar a 37°C até evaporar o etanol residual

Diluir em 12 µl H₂O/DEPC (10 µl transcrição, 2 µl guardar)

Colocar em banho-maria a 55°C por 5 min

Transcrição *in vitro*

10µl dscDNA (entrar com máximo de 20µg de cDNA)

Reação:

7,5µl of 25mM rNTP (A,G,C and UTP, prepare apenas o necessário para a reação) (7,5x N tubos/4)

5 µl 5x *reaction buffer*

2,5 µl *enzyme mix (Rnase inhibitor and T7 phage polymerase)*

Incubar a 37°C por 5 hs.

Purificação do RNA usando Trizol

(centrífuga refrigerada a 4°C e ETOH a -20°C)

Adicionar 25 µl de água/DEPC à reação

Descongelar a reação no gelo

Adicionar 1ml of Trizol em cada tubo – tubos de 1,5 ml

Inverter 2 min

Incubar a temperatura ambiente por 3 min

Adicionar 200 µl clorofórmio por 1 ml de solução de Trizol. Inverter.

Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.

Centrifugar 12.000g por 15 minutos a 4°C

Transferir a fase aquosa (~ 600µl) para um novo tubo e adicionar isopropanol na

proporção de 1:1 em relação à fase aquosa (não retirar muito da fase aquosa)

Adicionar: ~ 600µl de isopropanol

60 µl de NaAc (10%) (3 M)

0,5 µl de glicogênio (20mg/mL)

Inverter

Incubar a temperatura ambiente por 20-30 minutos.

Centrifugar a 14.000 rpm por 20 minutos.

Reservar isopropanol.

Lavar o pellet 6 X com 1 ml de solução 70% ETOH preparado com água DEPC

Centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos.

Secar o pellet a 37-42°C por alguns min (~ 2min)

Ressuspender em 21ul de H₂O-DEPC (1µl para quantificação).

Colocar em banho-maria a 55°C por 10 min

**Avaliar. Integridade, qualidade e
quantidade do RNA amplificado.**

Oligonucleotídeos:

* Oligo dT(24) – T7 Primer

5' - GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA

CTC ACT ATA GGG AGG CGG TTT TTT

TTT TTT TTT TTT TTT TTT – 3'

** Oligo dT(15) – T7 Primer

5'- AAA CGA CGG GTG AAT TGT AAT

ACG ACT CAC TAT AGG CGG TTT TTT

TTT TTT TTT – 3'

Anexo 2 - Resultados de diferença de expressão entre DCIS puro e componente *in situ* do DCIS-IDC avaliados por RT-qPCR, utilizando o sistema *Taqman*.

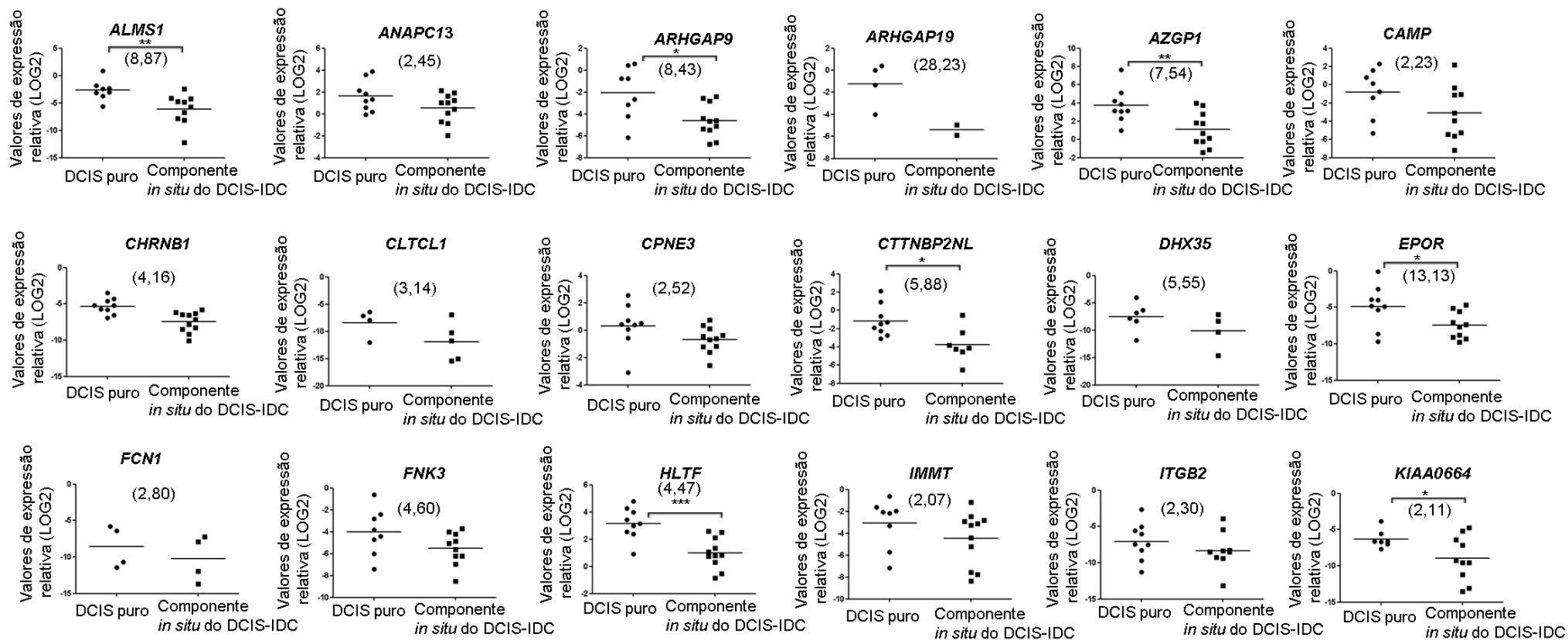
Genes	cDNA Microarray * (fold change e P<0,01)	RT-qPCR (fold change) Todas as amostras	P	RT-qPCR (fold-change) Amostras com mesmo grau nuclear	P
<i>ADFP</i>	2,79	1,22	0,75	1,12	0,75
<i>ALMS1</i>	3,8	6,34	0,003	8,87	0,007
<i>ANAPC13</i>	2,19	3,0	0,013	2,45	0,08
<i>ARHGAP19</i>	2,2	11,95	0,03	28,23	0,05
<i>ARHGAP9</i>	2,92	10,17	0,0013	8,43	0,01
<i>AZGP1</i>	2,94	4,29	0,01	7,54	0,005
<i>C16orf5</i>	5,45	1,19	0,78	1,13	0,75
<i>C3AR1</i>	3,04	-1,4	0,7	-2,14	0,21
<i>CAMP</i>	2,84	3,08	0,03	2,23	0,11
<i>CHRNB1</i>	5,11	3,08	0,01	4,16	0,44
<i>CHST10</i>	5,07	1,29	0,97	1,12	0,96
<i>CLTCL1</i>	2,07	3,70	0,03	3,14	0,13
<i>CORO1C</i>	-3,05	3,06	0,15	2,11	0,21
<i>CPNE3</i>	2,38	2,83	0,02	2,52	0,10
<i>CTTNBP2NL</i>	4,84	4,78	0,009	5,88	0,01
<i>DENND3</i>	3,51	2,12	0,39	1,77	0,78
<i>DGCR2</i>	2,96	1,41	0,21	1,06	0,46
<i>DHX35</i>	3,07	5,95	0,09	5,55	0,19
<i>EPOR</i>	2,99	10,51	0,01	13,13	0,03
<i>ERC1</i>	3,86	1,37	0,09	1,21	0,16
<i>FCN1</i>	3,79	2,80	0,46	2,80	0,46
<i>FGFBP1</i>	3,28	NA	NA	NA	NA
<i>FN3K</i>	6,3	2,8	0,17	4,60	0,09
<i>GBGT1</i>	4,06	1,67	0,87	1,47	0,80
<i>GOSR2</i>	3,97	1,75	0,05	1,86	0,06
<i>HLTF</i>	2,84	2,98	0,001	4,47	0,0005
<i>IFT57</i>	3,30	2,00	0,05	1,71	0,20
<i>IMMT</i>	2,92	1,51	0,30	2,07	0,22
<i>IRF8</i>	4,33	2,62	0,16	2,00	0,40
<i>ITGB2</i>	3,27	2,99	0,10	2,30	0,32

Cont/ Anexo 2

KIAA0664	3,45	1,66	0,07	2,11	0,04
LOX	-2,01	-4,21	0,85	-5,52	0,44
LPXN	3,2	2,47	0,29	2,08	0,91
LSM4	2,85	3,53	0,003	2,93	0,02
MBD3	4,58	-2,76	0,56	-3,67	0,53
NEDD9	6,02	1,78	0,68	1,66	0,75
NGDN	2,59	-1,02	0,47	-1,13	0,49
NMU	-4,12	1,38	0,63	-1,13	0,72
OSBPL7	4,91	NA	NA	NA	NA
P4HB	3,01	2,13	0,03	1,82	0,07
PCDH10	3,01	NA	NA	NA	NA
PEPD	3,65	2,12	0,11	2,04	0,13
PIAS2	2,43	1,68	0,5	1,51	0,70
PMPCA	4,2	1,57	0,16	1,39	0,33
PPTC7	2,92	-1,08	0,69	1,09	0,49
PTBP2	-2,84	1,49	0,97	1,59	0,93
RABEPK	4,94	2,17	0,03	2,21	0,05
RAD51AP1	-2,96	1,02	0,64	-1,22	0,86
RARRES3	3,64	3,38	0,01	2,85	0,07
REC8	3,37	9,5	0,008	5,82	0,03
SAMD4A	4,11	7,8	0,08	6,25	0,08
SLC6A20	3,54	NA	NA	NA	NA
SOX13	3,58	1,63	0,27	1,55	0,36
STX11	3,18	NA	NA	NA	NA
SULF1	-3,92	-2,0	0,14	-1,62	0,11
SYN1	2,97	NA	NA	NA	NA
TARDBP	4,03	6,02	0,32	7,24	0,32
TRAP1	3,5	1,48	0,04	1,25	0,10
TXNDC11	6	1,05	0,46	-1,05	0,56
UTP20	3,16	2,76	0,001	2,86	0,003
ZBTB5	2,82	NA	NA	NA	NA

Valores positivos indicam maior expressão em DCIS puro, enquanto que valores negativos demonstram maior expressão no componente *in situ* do DCIS-IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; NA, não avaliável. (*) Castro et al. 2008.

Anexo 3 - Gráficos de expressão na análise de RT-qPCR pelo sistema *Taqman* considerando amostras com mesmo grau nuclear.



Cont/ Anexo 3

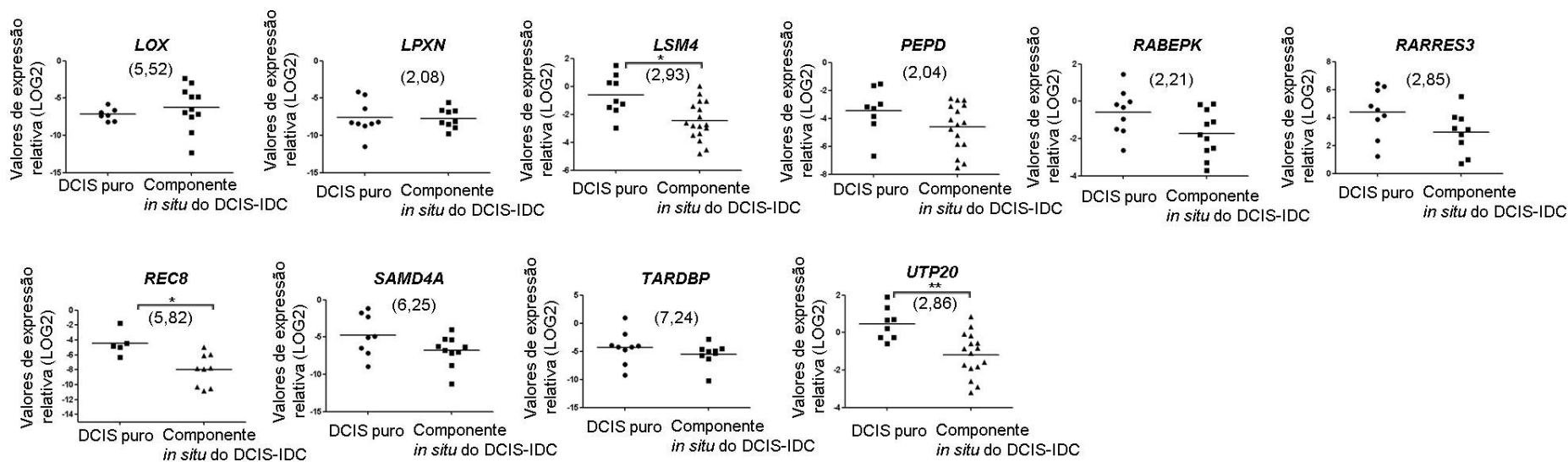
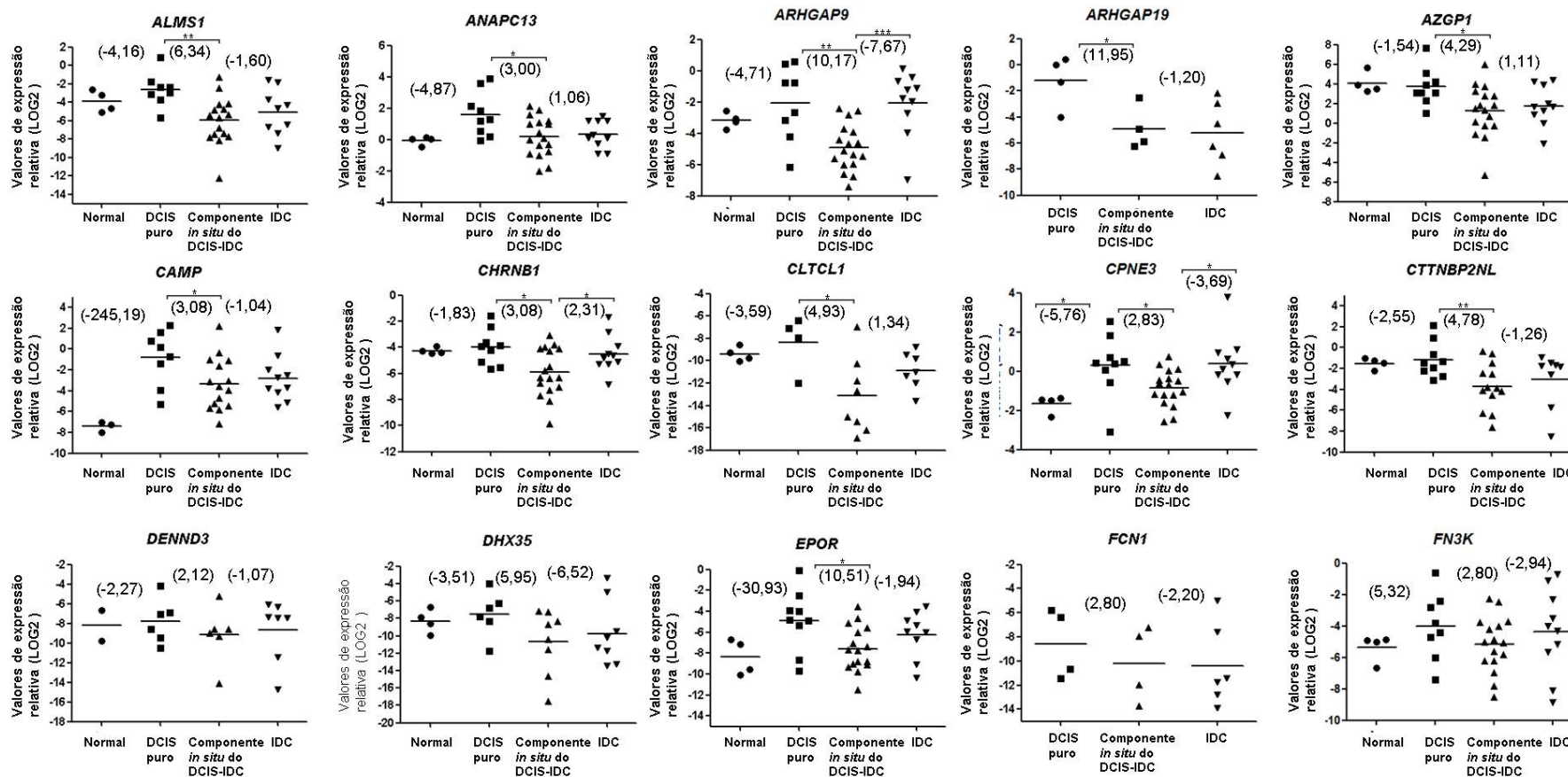


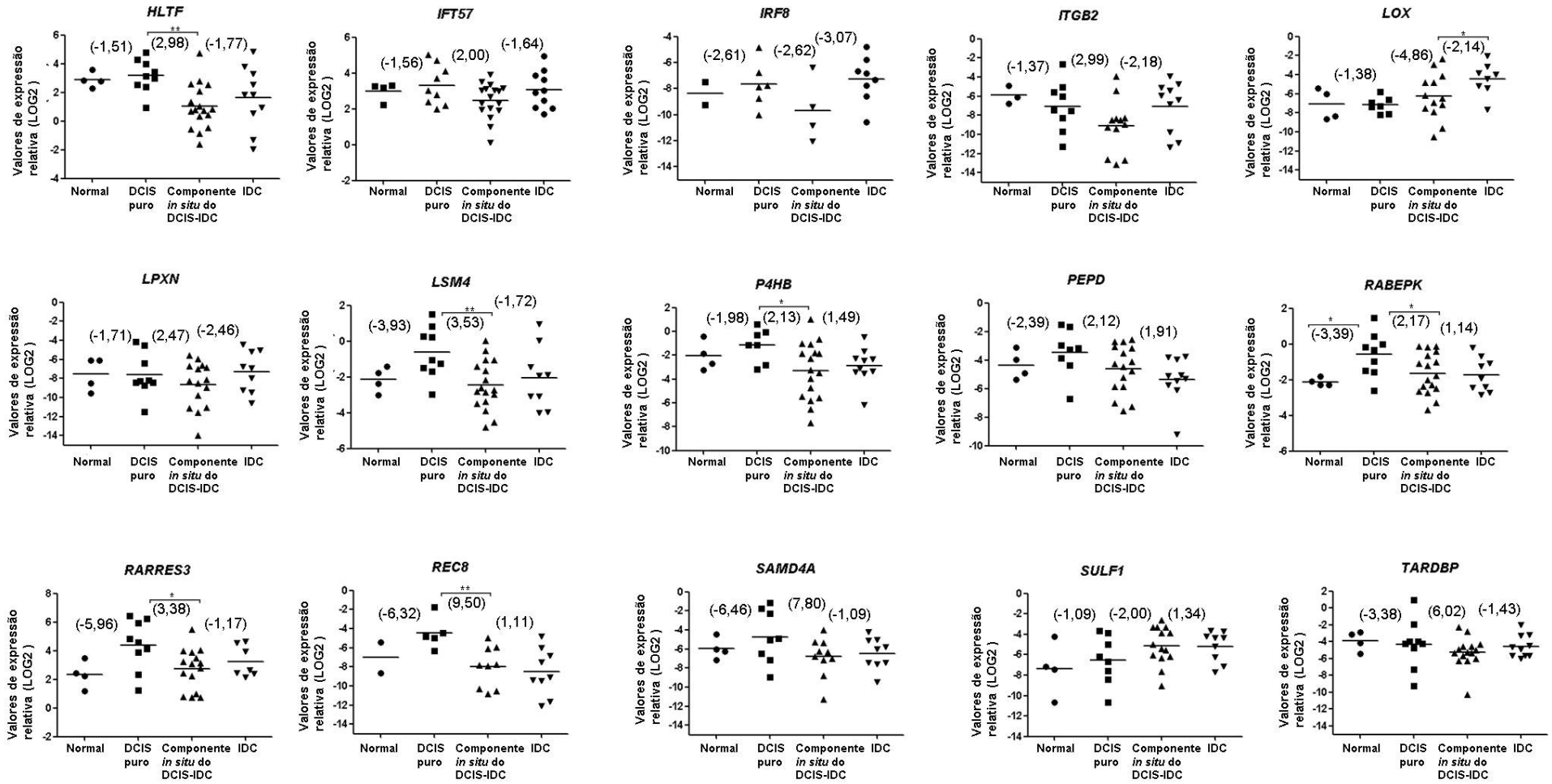
Gráfico dos genes avaliados por RT-qPCR, com o sistema *Taqman*, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray*, considerando amostras com o mesmo grau nuclear. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$.

Anexo 4 - Gráficos de expressão ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama dos genes validados por RT-qPCR.

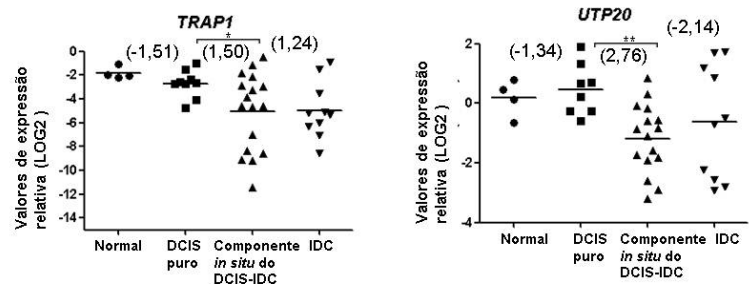
Genes validados pelo sistema *Taqman*



Cont/ Anexo 4



Cont/ Anexo 4



Genes validados pelo sistema SYBR green

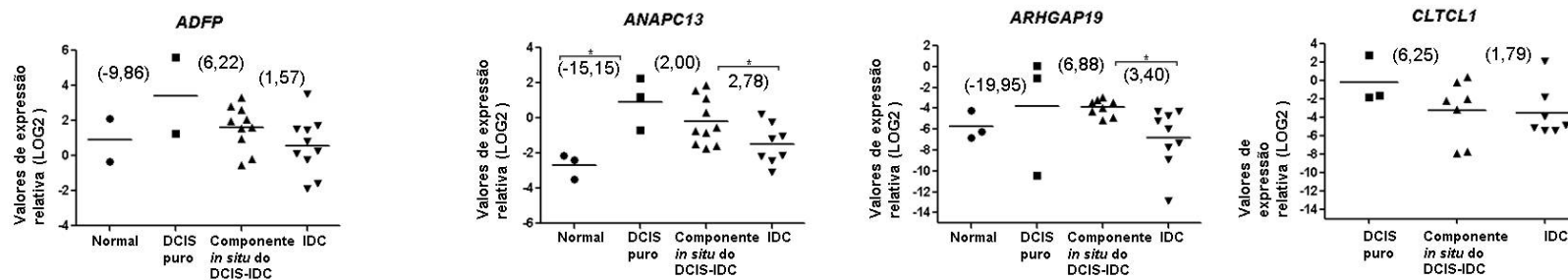
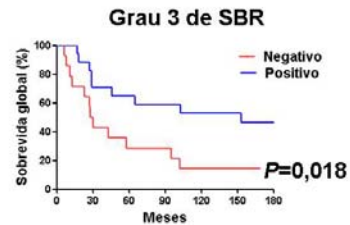
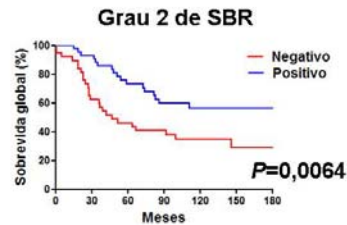
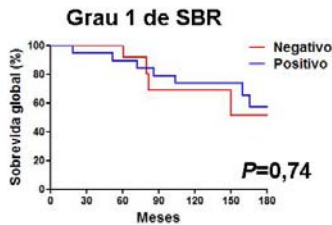
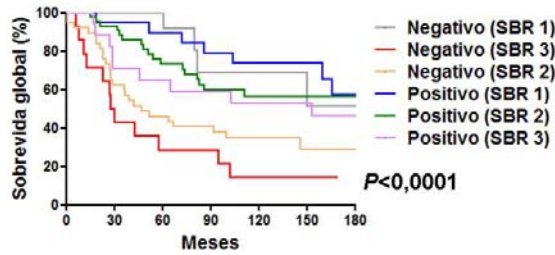


Gráfico dos genes avaliados por RT-qPCR com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray*. Entre parênteses (), estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre DCIS puro e o componente *in situ* do DCIS-IDC. Abreviações: DCIS, carcinoma ductal *in situ*; DCIS-IDC, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

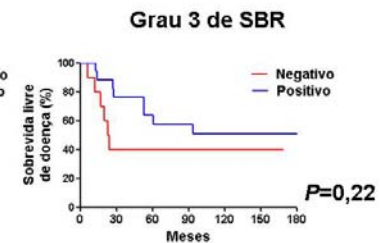
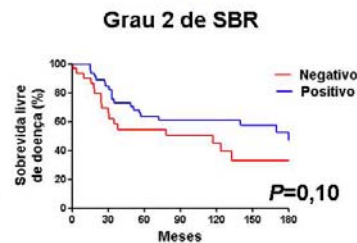
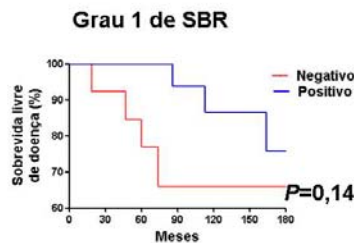
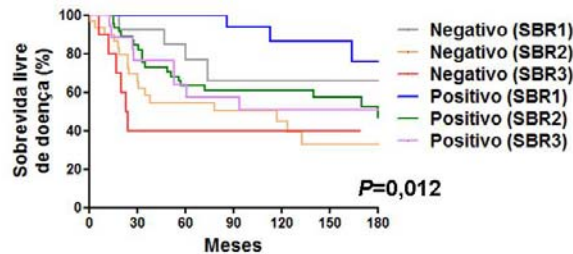
Anexo 5 - Associação entre expressão de ANAPC13 e sobrevida global e livre de doença em pacientes com grau de SBR 1, 2 ou 3 e com ≤ 3 ou >3 linfonodos comprometidos.

ANAPC13 e grau de SBR

Sobrevida global

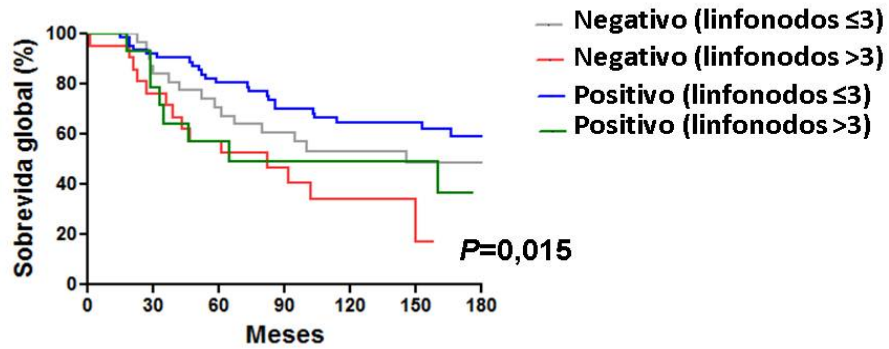


Sobrevida livre de doença

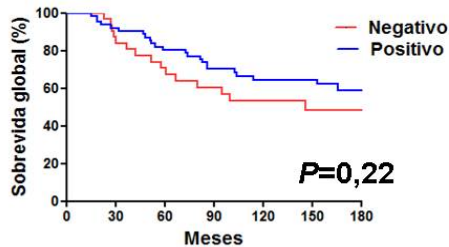


ANAPC13 e comprometimento de linfonodos

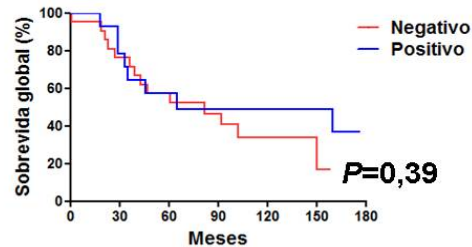
Sobrevida global



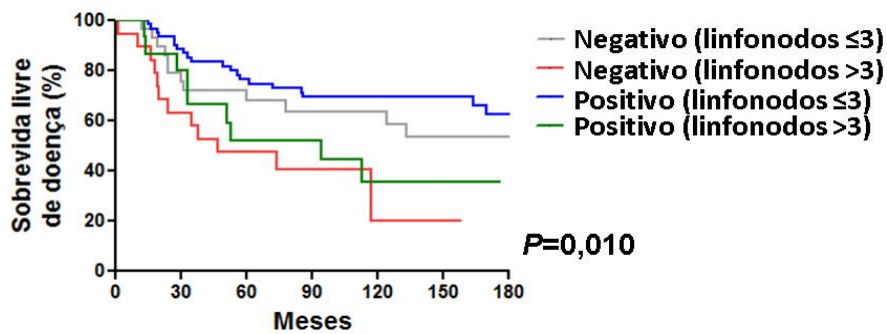
≤3 linfonodos comprometidos



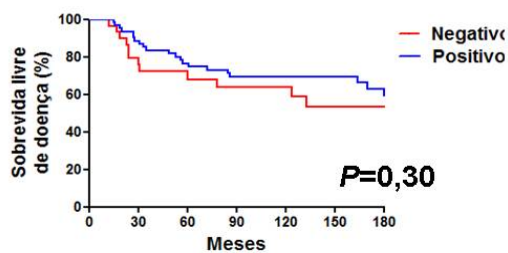
>3 linfonodos comprometidos



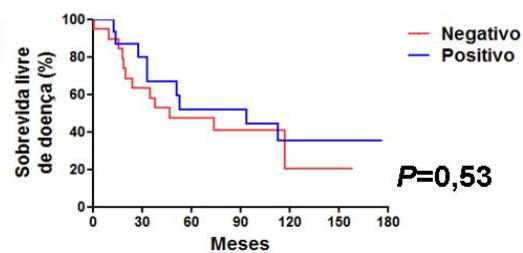
Sobrevida livre de doença



≤3 linfonodos comprometidos



>3 linfonodos comprometidos



Anexo 6 - Genes co-regulados ao *ANAPC13*, pertencentes a perfis de expressão (A e B) que apresentam enriquecimento de processos biológicos relacionados ao ciclo celular.

Genes do perfil A	Genes do Perfil B
<i>AUH</i>	<i>ANXA6</i>
<i>CTNNAL1</i>	<i>AGTPBP1</i>
<i>CKS2</i>	<i>BIRC5</i>
<i>CDC25C</i>	<i>BUB1</i>
<i>CDCA2</i>	<i>CA12</i>
<i>CEP55</i>	<i>CTF1</i>
<i>CHN1</i>	<i>CTSZ</i>
<i>C14ORF143</i>	<i>CKS1B</i>
<i>C6ORF173</i>	<i>CDCA4</i>
<i>C6ORF182</i>	<i>CDCA8</i>
<i>F12</i>	<i>CENPA</i>
<i>CCDC153</i>	<i>CENPM</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>CHAF1B</i>
<i>CDKN3</i>	<i>LOC399815</i>
<i>CISH</i>	<i>C12ORF76</i>
<i>DLGAP5</i>	<i>C13ORF27</i>
<i>DNA2</i>	<i>C14ORF80</i>
<i>EME1</i>	<i>C16ORF59</i>
<i>FAM64A</i>	<i>C21ORF45</i>
<i>FANCE</i>	<i>C3ORF26</i>
<i>GRAMD1C</i>	<i>C5ORF34</i>
<i>LOC84989</i>	<i>CCDC41</i>
<i>LOC375295</i>	<i>CKAP2L</i>
<i>IQGAP3</i>	<i>DZIP3</i>
<i>KIF23</i>	<i>DMRTA1</i>
<i>MNS1</i>	<i>EFHD1</i>
<i>MND1</i>	<i>EHD2</i>
<i>MT1B</i>	<i>ENO3</i>
<i>MT1L</i>	<i>FAM132A</i>
<i>MAP1D</i>	<i>FAM24B</i>
<i>MTG1</i>	<i>FAM72A</i>
<i>NDC80</i>	<i>FCGRT</i>
<i>OSTF1</i>	<i>GPR68</i>

Cont/ Anexo 6

Genes do perfil A	Genes do Perfil B
<i>PHF19</i>	<i>GCSH</i>
<i>PDE5A</i>	<i>H19</i>
<i>PKP2</i>	<i>HIST1H4L</i>
<i>PLK4</i>	<i>BAT1</i>
<i>PRIM2</i>	<i>HOXA7</i>
<i>PTPRV</i>	<i>HMMR</i>
<i>PCBD2</i>	<i>HSDL2</i>
<i>RACGAP1</i>	<i>LOC100128511</i>
<i>RAD51AP1</i>	<i>LOC220930</i>
<i>RADIL</i>	<i>LOC100129269</i>
<i>STIL</i>	<i>MAD2L1</i>
<i>SELL</i>	<i>MPP6</i>
<i>STMN1</i>	<i>MT1E</i>
<i>STON1</i>	<i>MT1F</i>
<i>SIP1</i>	<i>MT1H</i>
<i>TYMS</i>	<i>MCM2</i>
<i>TRAIP</i>	<i>MRPL15</i>
<i>TTK</i>	<i>NTN1</i>
<i>ZNF239</i>	<i>NLN</i>
	<i>NCRNA00152</i>
	<i>NPM3</i>
	<i>NUF2</i>
	<i>OSR2</i>
	<i>PHF17</i>
	<i>PRTFDC1</i>
	<i>PCOLCE2</i>
	<i>PSRC1</i>
	<i>PKN3</i>
	<i>PYROXD2</i>
	<i>RDM1</i>
	<i>RFX3</i>
	<i>RFC4</i>
	<i>SIVA1</i>
	<i>SLC39A4</i>
	<i>SKA1</i>

Cont/ Anexo 6

SUV39H1

SUV39H2

THNSL1

TIPIN

TOP2A

TACC3

TGM2

TP53

UNC13D

MYC

WDR51A

Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: Early Events in the Progression of Preinvasive Ductal Carcinoma of the Breast^{1,2}

Carolina Sens-Abuázar*, Elisa Napolitano e Ferreira*, Cynthia Aparecida Bueno Toledo Osório[†], Ana Cristina Victorino Krepschi^{‡,§}, Tatiana Iervolino Ricca*, Nadia Pereira Castro*, Isabela Werneck da Cunha[†], Maria do Socorro Maciel[¶], Carla Rosenberg^{§,#}, Maria Mitzi Brentani**, Fernando Augusto Soares[†], Rafael Malagoli Rocha[†] and Dirce Maria Carraro*[§]

*Laboratory of Genomics and Molecular Biology, International Center of Research and Teaching, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, SP, Brazil; [†]Department of Investigative Pathology, International Center of Research and Teaching, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, SP, Brazil; [‡]Laboratory of Cancer Genetics, International Center of Research and Teaching, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, SP, Brazil; [§]National Institute of Science and Technology in Oncogenomics, São Paulo, SP, Brazil; [¶]Department of Mastology, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, SP, Brazil; [#]Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; **Department of Radiology, Discipline of Oncology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

Alterations in the gene expression profile in epithelial cells during breast ductal carcinoma (DC) progression have been shown to occur mainly between pure ductal carcinoma *in situ* (DCIS) to the *in situ* component of a lesion with coexisting invasive ductal carcinoma (DCIS-IDC) implying that the molecular program for invasion is already established in the preinvasive lesion. For assessing early molecular alterations in epithelial cells that trigger tumorigenesis and testing them as prognostic markers for breast ductal carcinoma progression, we analyzed, by reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction, eight genes previously identified as differentially expressed between epithelial tumor cells populations captured from preinvasive lesions with distinct malignant potential, pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC. *ANAPC13* and *CLTCL1* down-regulation revealed to be early events of DC progression that anticipated the invasiveness manifestation. Further down-regulation of *ANAPC13* also occurred after invasion appearance and the presence of the protein in invasive tumor samples was associated with higher rates of overall and disease-free survival in breast cancer patients. Furthermore, tumors with low levels of *ANAPC13* displayed increased copy number alterations, with significant gains at 1q (1q23.1-1q32.1), 8q, and 17q (17q24.2), regions that display common imbalances in breast tumors, suggesting that down-regulation of *ANAPC13* contributes to genomic instability in this disease.

Translational Oncology (2012) 5, 113–123

Address all correspondence to: Dirce Maria Carraro, PhD, CIPE-International Center of Research and Teaching, Laboratory of Genomics and Molecular Biology, A.C. Camargo Hospital, Rua Tagua, 440, CEP 01508-010 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: dirce.carraro@cipe.accamargo.org.br

¹This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CEPID/FAPESP 98/14335). C.S.A. was supported by CNPq (142790/2008-7) and FAPESP (2009/00669-2). T.I.R. was supported by FAPESP (2009/02457-2). The authors declare no conflicts of interest.

²This article refers to supplementary materials, which are designated by Tables W1 to W9 and Figure W1 and are available online at www.transonc.com.

Received 15 September 2011; Revised 16 December 2011; Accepted 21 December 2011

Introduction

Breast carcinoma is a complex disease that displays molecular heterogeneity at both the preinvasive [1–4] and invasive [5,6] stages. Gene expression pattern is mainly influenced by the expression of hormonal receptors, estrogen (ER) and progesterone (PR) and *ERBB2* oncogene, and tumor classification based on expression profile leads to significant repercussion on prognosis [5,6].

Ductal carcinoma (DC) of the breast represents 80% of all breast tumors [7] and can be manifested as *in situ* (DCIS) or as invasive carcinoma (IDC), the latter of which can be present with or without an *in situ* component (DCIS-IDC). DCIS is characterized by the confinement of cells within ducts, maintenance of the basal membrane and lack of stromal invasion. IDC is characterized by the spreading of cancer cells through ducts by crossing the basal membrane, leading to stromal invasion.

DCIS is thought to be a precursor of IDC [8,9], and its progression is not predictable using the currently available resources. Conventional histologic features and biomarkers are not effective for classifying pure DCIS lesions regarding their ability to invade surrounding tissues and, consequently, trigger disease progression.

Cell-based studies have reported negligible differences in gene expression patterns between epithelial cells from IDC and those from the *in situ* component of DCIS-IDC lesions [10–12], suggesting that genetic and molecular abnormalities, important for the acquisition of invasiveness, are already present in preinvasive epithelial cells [10,13–15]. In addition, surrounding myoepithelial cells [16–18] and fibroblast cells [17,19] certainly play a fundamental role in invasion process.

We have previously shown that most of the divergences in gene expression patterns during the course of breast tumor progression occur between epithelial cells from pure DCIS and those from the *in situ* component of DCIS-IDC lesions [10]. Therefore, the assessment of the molecular divergence of epithelial tumor cells of same morphology but with completely different malignant potentials may uncover key molecular events involved in early steps of DC progression.

In this sense, the goal of this study was to investigate the earliest molecular alterations important for acquiring invasive capability and to discover prognostic factors for DC of the breast. Thus, we assessed, by reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), the expression of eight candidate genes chosen from our previously published gene expression signature [10], in laser-capture microdissected epithelial tumor cells from pure DCIS and from the *in situ* component of DCIS-IDC lesions. The criterion of gene selection was based on the availability of commercial antibodies for a posterior immunohistochemistry (IHC) analysis. Protein expression was evaluated in a panel of pure DCIS, *in situ* component of DCIS-IDC and IDC lesions. *ANAPC13* and *CLTCL1* were showed to be implicated in the earliest steps of malignant process of tumor cells. *ANAPC13* (anaphase-promoting complex subunit 13) encodes a 74-amino acid protein [20] that participates in the anaphase-promoting complex (APC/C), a large ubiquitin ligase that controls cell cycle progression [21], and it is essential at the metaphase-to-anaphase transition. *CLTCL1* (clathrin, heavy chain-like 1) belongs to the clathrin family and encodes a protein of 1640 amino acids that is highly expressed in muscle tissues [22,23]. Clathrins are essential for intracellular traffic [24,25] and participate in the stabilization of mitotic spindle fibers [26]. The results demonstrated that decreases in *ANAPC13* and *CLTCL1* expression occur before DCIS cells manifest morphologic aspects of invasion. Furthermore, decrease in *ANAPC13* expression seems to be also involved in late stages of tumor progression and in increasing genomic instability. Moreover, the presence of *ANAPC13*

protein was associated with higher rates of overall survival and disease-free survival in general IDC. Together, these results suggest *ANAPC13* as a promising novel molecular prognostic markers for DC.

Materials and Methods

Samples

Frozen samples from five pure DCIS, 15 *in situ* component of DCIS-IDC and 10 IDC lesions were used for laser microdissection and RT-qPCR (Table 1). An independent set of 42 frozen specimens from IDC lesions was also used. These samples were manually dissected for enrichment of at least 70% of tumor cells. DNA from the same 42 samples was used for mutation screening and from 33 of these 42 was used for array comparative genomic hybridization (aCGH). Total RNA from the 33 samples was used for RT-qPCR. For IHC, an independent set of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor breast tissues were organized in two tissue microarrays as described [27] (Table W1). TMA1 was composed of 41 pure DCIS and 36 *in situ* component of DCIS-IDC samples, and TMA2 consisted of 187 IDC samples.

For pure DCIS lesions, all slides from each patient were examined by pathologists to ensure the absence of any previously undetected microinvasion. The classification of DCIS samples is in accordance with the World Health Organization guidelines, and the Nottingham (Elston-Ellis) modification of the Scarff-Bloom-Richardson grade system (SBR grade) was applied for IDC samples.

All breast cancer samples were previously analyzed by IHC for the expression of ER (rabbit monoclonal anti-ER, clone SP1; Dako, Carpinteria, CA), PR (mouse monoclonal anti-PR, clone PgR636; Dako), and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) (rabbit polyclonal anti-HER2, 1:1000; Dako). ER, PR, and HER2 were evaluated according to the recommendations of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists guidelines [28,29]. *HER2* amplification was assessed in positive 2+ IDC samples by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis, following the manufacturer's standard methods (Dako), and hybridization was performed with *HER2/CEN-17* probes (Dako). Results were interpreted using the algorithm established by the American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists guidelines [29]. IDC samples were classified as luminal A (ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁻), luminal B (ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁺), HER2⁺ (ER⁻, PR⁻, HER2⁺), basal-like (ER⁻, PR⁻, HER2⁻, cytokeratin (CK) 5/6⁺ and/or epidermal growth factor receptor (EGFR⁺)), or unclassified (negative for all five markers) according to Perou et al. [5] and Khramtsov et al. [30]. The inclusion criteria were female patients with ductal carcinoma without preoperative systemic treatment. Samples were obtained from the tumor bank and the archives of the Department of Investigative Pathology, A.C. Camargo Hospital Tumor Bank, São Paulo, Brazil. This study was approved by the Ethics Committee of the Medical and Research Center of A. C. Camargo Hospital (1143/08).

RNA/DNA Extraction and RNA Amplification

Approximately 4000 cells were laser captured from frozen tissues of specific component of each breast ductal lesion with PixCell II LCM system (Arcturus Engineering, Mountain View, CA). RNA isolation and amplification were performed as described by Castro et al. [10]. RNA isolation of manually dissected frozen tissues was performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD). DNA was isolated by incubating in 600 μ l of digestion buffer (25 mM EDTA,

Table 1. Characteristics of Patients and Tumors Selected for RT-qPCR Analysis.

Sample Type	Sample Name	Clinical Stage	Age at Diagnosis (Years)	pTNM	Nuclear Grade	SBR Grade	ER Status	PR Status	P53 Status	HER2 Immunostaining
Pure DCIS	1	0	37	Tis N0 M0	ND	-	-	-	+	ND
	2	0	44	Tis N0 M0	2 and 3	-	+	+	-	0
	3	0	43	Tis N0 M0	3	-	+	+	-	(3+)
	4	0	52	Tis N0 M0	3	-	+	+	-	(3+)
	5	0	58	Tis N0 M0	3	-	-	-	-	(3+)
DCIS-IDC*	6	IIa	48	T2 N0 M0	3	II	+	+	+	(1+)
	7	IIa	75	T2 N0 M0	2	II	+	+	+	(2+)
	8	IIa	34	T1c N0 M0	3	II	+	+	+	(3+)
	9	I	55	T1 N0 M0	3	ND	-	-	+	(3+)
	10	IIIb	44	T4b N1 M0	2	III	+	+	ND	(2+)
	11	IIb/IIa	57	T2 N2 M0	2	II	+	+	ND	(2+)
	12	IIb	43	T2 N0 M0	2	II	-	-	+	(3+)
	13	IIa	48	T2 N0 M0	2	II	+	+	-	(2+)
	14	I	73	T3 N0 M0	2	II	+	+	-	(2+)
	15	ND	46	T2 N1 M0	3	II	+	+	+	(2+)
	16	IIa	48	T2 N1 M0	3	II	-	-	-	(2+)
	17	ND	63	T2 N0 M0	1	ND	+	-	-	(2+)
	18	ND	39	T1c N0 M0	ND	ND	+	+	ND	(3+)
	19	ND	49	T1c N0 M0	ND	ND	+	+	ND	(0)
	20	IIb	69	T2 N1 M0	ND	ND	+	+	ND	(2+)
IDC	21	IIa	45	T2 N0 M0	2	II	-	-	-	(3+)
	22	IIa	43	T1c N0 M0	3	II	+	-	-	(3+)
	23	IIa	54	T2 N0 M0	3	II	+	+	+	(3+)
	24	IIIb	71	T4 N2 M0	3	III	+	+	+	(2+)
	25	IIa	43	T2 N0 M0	3	III	-	ND	ND	(3+)
	26	IIIa	43	T2 N2 M0	3	III	+	+	ND	(2+)
	27	I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	28	IIa	44	T1 N1 M0	3	II	+	+	-	(1+)
	29	IIb	31	T2 N1 M0	3	II	-	-	+	(3+)
	30	IIIa	54	T3 N1 M0	3	III	-	-	-	(2+) (1+)

DCIS indicates ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma; ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; ND, not determined; PR, progesterone receptor; pTNM, pathologic tumor size, nodal status, and metastasis.

*DCIS-IDC samples were classified according to the IDC lesion.

pH 8.0, 0.25% of sodium dodecyl sulfate, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 300 µg of proteinase K) at 55°C overnight, followed by 100% ethanol precipitation, and 70% ethanol washes, and DNA was recovered in Tris-EDTA, pH 8.0.

RT-qPCR

Complementary DNA converted from 1 µg of amplified RNA (aRNA) or total RNA, purified from laser-capture microdissected cells or manually dissected IDC tissues, respectively, was used as template for RT-qPCR analysis. RT-qPCRs were performed using the ABI Prism 7900HT Fast Real-time Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were carried out in duplicates using SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems) in a total volume of 20 µl. Dissociation curves were analyzed for each primer pair to verify the specificity of the RT-qPCR reaction. Only samples with differences ≤0.6 in quantification cycle (Cq) between duplicates were considered for the analysis. Five endogenous control genes, *ACTB*, *BCR*, *GAPDH*, *HPRT1*, and *RPLP0* were evaluated. The two most stable endogenous genes (*HPRT1* and *RPLP0*) were selected by using geNorm [31]. Relative gene expression quantification was calculated using the efficiency-corrected equation [32]. The list of primers used is shown in Table W2.

Immunohistochemistry

IHC was performed as previously described [27]. Slides were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-ADFP (clone aa5-27, 1:50, Life Span Biosciences, Seattle, WA), rabbit polyclonal anti-ANAPC13 (1:30; Sigma Aldrich, St. Louis,

MO), goat polyclonal ARHGAP19 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and mouse monoclonal anti-CLTCL1 (clone 2Q2166, 1:300; Abcam, Cambridge, MA) for 2 hours. Samples stained without the primary antibody were used as negative controls. Normal breast tissues, known to express these proteins, according to the Human Protein Atlas were used as positive controls. Samples were analyzed microscopically (Axioskop 40; Carl Zeiss Co, Tokyo, Japan) by a pathologist. Nuclear and cytoplasmic staining patterns were considered in the analysis when detected in at least 10% of the cells. Nuclear staining was classified using the Allred score (scores 0-8) [33]. Samples were categorized as negative (scores 0-3) or positive (scores 4-8). Cytoplasmic staining was considered as absent, weak, moderate, and strong staining. For determining the correspondence between messenger RNA (mRNA) and protein, samples were categorized as negative (absent and weak) or positive (moderate and strong).

ANAPC13 and CLTCL1 Antibody Specificity

For both proteins, ANAPC13 and CLTCL1, Western blot assays were performed for assessing antibodies specificity as described [34]. Proteins were detected using rabbit polyclonal anti-ANAPC13 (1:500; Sigma Aldrich) and mouse monoclonal anti-CLTCL1 (clone 2Q2166, 1:150; Abcam) antibodies. Signals were detected using ECL horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin G whole antibodies (1:1500; GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Proteins from MCF7 (HTB-22) and SK-BR-3 (HTB-30) human breast cancer cell lines (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) were used. Cell lines were propagated following ATCC recommendations.

ANAPC13 Mutation Screening

Primers corresponding to all exonic regions and also the exon/intron borders of *ANAPC13* were designed (Table W2). *ANAPC13* mutation screening was performed for the 42 frozen IDC samples. PCR products were confirmed by agarose gel electrophoresis and sequenced using the 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). For all samples, sequences were obtained using both forward and reverse primers and analyzed in CLC DNA Genomics Workbench software 4.5 (CLCbio, Katrinebjerg, Denmark), using RefSeq NM_015391.3 as reference.

Investigation of Copy Number Alterations by Whole Genome Comparative Genomic Hybridization on Microarrays

Array CGH (aCGH) investigation was performed on 33 of the 42 frozen IDC samples by oligonucleotide array CGH using whole-genome platforms from Agilent Technologies (Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarrays 8×60K [containing 60,000 oligonucleotides probes] and 4×180K [containing 180,000 oligonucleotides probes]). Briefly, samples were labeled with Cy3- and Cy5-dCTPs by random priming, and purification, hybridization, and washing were carried out as recommended by the manufacturer. Scanned images of the arrays were processed using Feature Extraction software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), and the analysis was carried out using Nexus Copy Number 5.1 (Biodiscovery, El Segundo, CA). For aCGH analysis, identification of aberrant copy number segments was based on FASST2 segmentation algorithm with default settings (threshold \log_2 ratio of 0.2 or 1.14 was used for gain or high copy gain, and -0.23 and -1.14 used for loss and homozygous loss, respectively), and the significance threshold was set on 1.0^{-7} . We considered at least three consecutive probes for calling a segment, and a filter against aberrations smaller than 150 kb was used.

Statistical Analysis

For RT-qPCR analyses, a criterion of fold change $\geq |2|$ was applied for considering differentially expressed genes. The IHC statistical analyses were performed with STATA software (Intercooled Stata release 7.0; Stata Corporation, College Station, TX). For the categorical variables, the χ^2 or Fisher exact test was applied. Overall survival and disease-free survival probabilities were calculated using the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to compare survival curves. The Cox regression model was used to estimate relative risks with a confidence interval of 95% and to obtain independent prognostic variables. Results were considered statistically significant when $P < .05$.

Results

Assessment of Gene Expression in Tumor Epithelial Cells from Pure DCIS and the In Situ Component of DCIS-IDC

To identify novel molecular markers for the progression of DC of the breast, we explored differences in gene expression that occur in epithelial cells from preinvasive lesions, pure DCIS, and the *in situ* component of DCIS-IDC. Epithelial tumor cells were captured by laser from five pure DCIS and from 15 *in situ* component of DCIS-IDC samples (Figure 1A and Table 1). Eight genes (*ADFP*, *ANAPC13*, *ARHGAP19*, *CLTCL1*, *CPNE3*, *IMMT*, *NGDN*, and *PIAS2*) selected from our previous study [10], were assessed by RT-qPCR in both cell populations, pure DCIS, and the *in situ* component of DCIS-IDC. For this analysis, complementary DNA was converted from amplified RNA and used for RT-qPCR experiments because no introduction of bias in relative gene expression was previously detected [35]. Four genes showed concordant results between RT-qPCR and microarray data [10], *ADFP* (RT-qPCR fold change = 2.79), *ANAPC13* (RT-qPCR fold change = 2.00), *ARHGAP19* (RT-qPCR fold change = 6.88), and *CLTCL1*

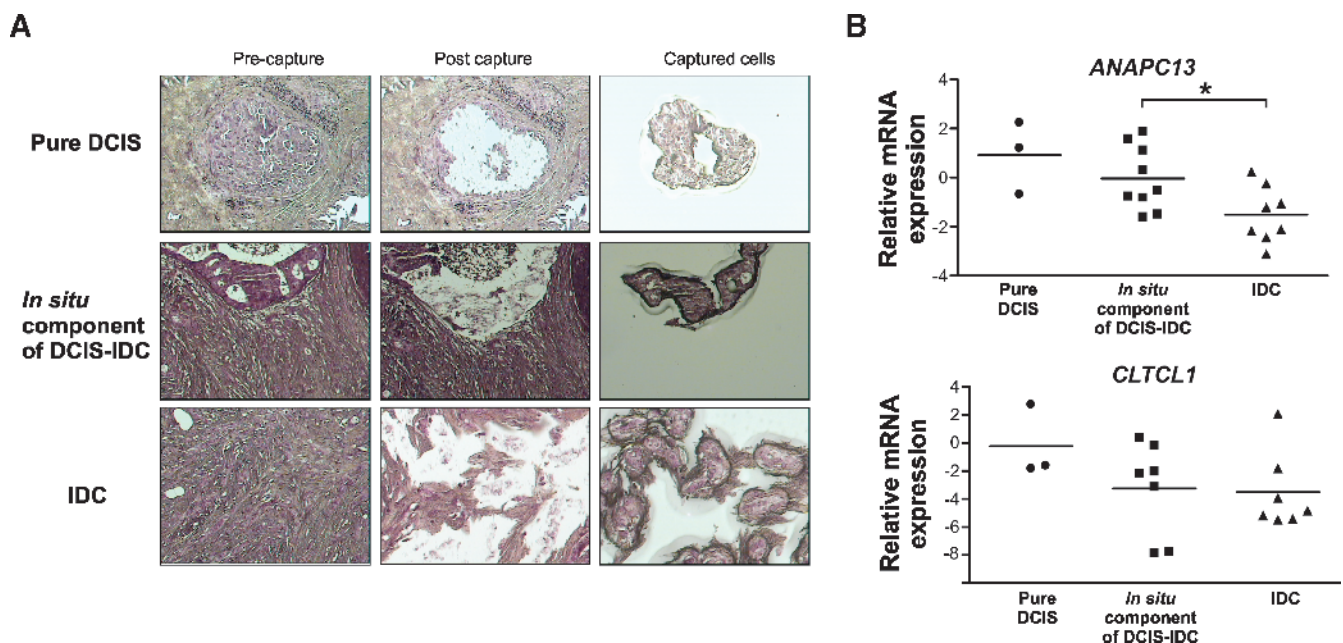


Figure 1. mRNA down-regulation of *ANAPC13* and *CLTCL1* along the progression of epithelial tumor cells of the breast. (A) Breast epithelial cells captured from pure DCIS, *in situ* component of DCIS-IDC and IDC lesions by laser-capture microdissection. Original magnifications, $\times 100$. (B) Relative mRNA expression of *ANAPC13* and *CLTCL1* in pure DCIS, *in situ* component of DCIS-IDC and IDC. DCIS indicates ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma; IDC, invasive ductal carcinoma. * $P < .05$.

Table 2. ANAPC13 and CLTCL1 Expression (Cytoplasmic Staining) in a Tissue Microarray Composed of *In Situ* Lesions.

Variable	Category	ANAPC13, n (%)*		P	CLTCL1, n (%)*		P
		Negative	Positive		Negative	Positive	
Histologic type of DCIS	Pure DCIS	11 (30.50)	25 (69.50)	.02 [†]	14 (40.00)	21 (60.00)	.04 [†]
	<i>In situ</i> component of DCIS-IDC	16 (59.20)	11 (40.80)		20 (64.50)	11 (35.50)	
Histologic subtype	Non-comedo	21 (41.20)	30 (58.80)	.42	29 (54.70)	24 (45.30)	.09
	Comedo	6 (54.60)	5 (45.40)		3 (27.30)	8 (72.70)	
Nuclear grade	Non-high grade	14 (41.20)	20 (58.80)	.49	19 (57.60)	14 (42.40)	.26
	High grade	13 (50.00)	13 (50.00)		13 (43.30)	17 (56.70)	
Histologic grade	Non-high grade	12 (38.70)	19 (61.30)	.32	18 (60.00)	12 (40.00)	.19
	High grade	13 (52.00)	12 (48.00)		12 (42.90)	16 (57.10)	
ER status	Negative	12 (75.00)	4 (25.00)	<.01 [‡]	11 (57.90)	8 (42.10)	.46
	Positive	12 (30.80)	27 (69.20)		19 (47.50)	21 (52.50)	
PR status	Negative	18 (62.10)	11 (37.90)	<.01 [‡]	16 (50.00)	16 (50.00)	.88
	Positive	6 (23.10)	20 (76.90)		13 (48.20)	14 (51.80)	
HER2 status	Negative	4 (57.00)	3 (43.00)	.68	5 (63.00)	3 (38.00)	.46
	Positive	21 (44.00)	27 (56.00)		22 (47.00)	25 (53.00)	

DCIS indicates ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma; ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; PR, progesterone receptor.

*Percentage considering number of cases with complete information.

[†]P value < 0.05.

[‡]P value < 0.01.

(RT-qPCR fold change = 6.25) displaying up-regulation in pure DCIS cells. The remaining four genes did not fulfill the adopted criterion differences in expression levels between epithelial cells from pure DCIS and those from the *in situ* component of DCIS-IDC.

Assessment of Protein Expression in Pure DCIS and in the In Situ Component of DCIS-IDC

To assess protein expression, samples from 41 pure DCIS lesions and 36 *in situ* component of DCIS-IDC lesions (TMA1) were stained with antibodies against ADFP, ANAPC13, ARHGAP19, and CLTCL1 and evaluated by IHC. ADFP and CLTCL1 showed cytoplasmic staining, whereas ANAPC13 and ARHGAP19 showed both nuclear and cytoplasmic staining. Samples were categorized as negative (absent or weak staining) or positive (moderate or strong staining). Results of cytoplasmic staining for ANAPC13 and CLTCL1 were concordant with those observed at the mRNA level (Figure 1B). Positive ANAPC13 was detected in 69.5% of pure DCIS samples and in 40.8% of *in situ* component of DCIS-IDC samples (P = .02). Positive CLTCL1 was detected in 60.0% of pure DCIS samples and in 35.5% of *in situ* component of DCIS-IDC samples (P = .04; Table 2). In contrast, no statistically significant differences were found in cytoplasmic staining for ADFP and ARHGAP19 and nuclear staining for ANAPC13 and ARHGAP19 between pure DCIS and *in situ* component of DCIS-IDC samples (Table W3). Assessment of associations between immunostaining patterns and clinicopathologic variables (Table 2) demonstrated statistically significant associations between positive cytoplasmic ANAPC13 samples and positive status for ER and PR (P < .01).

To better characterize the protein sublocation of ANAPC13 and CLTCL1, we firstly assessed the antibodies specificity (Figure 2) and then evaluated 10 entire lesions (5 pure DCIS and 5 *in situ* component of DCIS-IDC lesions) using ScanScope XT scanner (Aperio, Vista, CA). Sharp patterns of nuclear and/or cytoplasmic staining were observed for ANAPC13. For CLTCL1, staining was mainly cytoplasmic with some membrane staining. No nonspecific stromal or parenchymal staining was observed for either antibody (Figure 2).

Assessment of the Transcriptional Levels of ANAPC13 and CLTCL1 during Tumor Progression

To assess modulation of ANAPC13 and CLTCL1 mRNA levels during the progression of tumor epithelial cells in DC, we evaluated epithelial cells captured from 10 invasive ductal carcinoma samples (IDC) by RT-qPCR. ANAPC13 mRNA levels progressively decreased in epithelial cells from IDC when compared with cells from the *in situ* component of DCIS-IDC lesions (fold change = 2.78; P = .02) (Figure 1B). No difference was observed in CLTCL1 expression between cells from the *in situ* component of DCIS-IDC and IDC cells (fold change = 1.00; P = .88) (Figure 1B).

Protein Expression of ANAPC13 and CLTCL1 during Tumor Progression

To investigate the protein levels of ANAPC13 and CLTCL1 during DC progression, cytoplasmic expression of both proteins was evaluated in a second TMA (TMA2) composed of 187 IDC tissues. Absent staining was observed in 39.0% of the IDC samples, whereas weak or moderate staining was detected in 40.1% and 20.9% of the cases, respectively. Strong cytoplasmic staining for ANAPC13 was not observed in IDC samples. Absent staining for CLTCL1 was observed in 25.2% of the samples, whereas weak, moderate, and strong staining were detected in 43.6%, 26.2%, and 5.0% of the IDC cases, respectively.

To confirm whether the mRNA and protein expression levels were in agreement during breast cancer progression, we assessed the frequency of samples categorized in IHC as negative (absent and weak staining) and as positive (moderate and strong staining) (Figure 3A) in each sample group (pure DCIS, *in situ* component of DCIS-IDC and IDC). Both proteins showed tendencies, similar to those observed at the mRNA level. The frequency of samples classified as positive for ANAPC13 protein was clearly reduced in IDC lesions. The opposite was observed for the samples classified as negative for ANAPC13 (Figure 3B). The frequency of positive samples for CLTCL1 was reduced in the *in situ* component of DCIS-IDC when compared with pure DCIS lesions; however, similar frequencies of CLTCL1-positive samples were observed between lesions representative of the *in situ* component of DCIS-IDC and of IDC (Figure 3B). Together, these

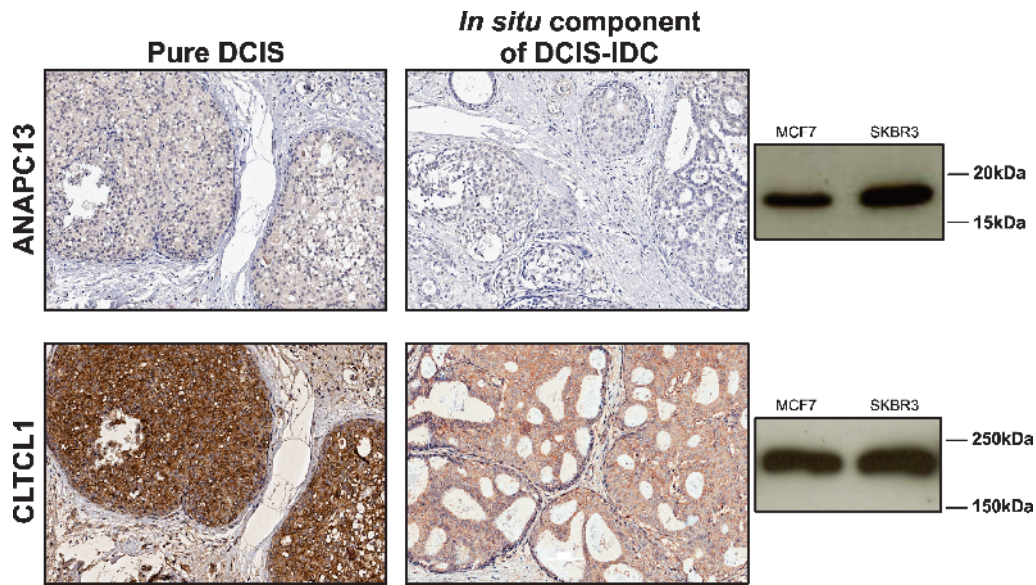


Figure 2. Protein expression of ANAPC13 and CLTCL1 in pure DCIS and in the *in situ* component of DCIS-IDC. Immunohistochemical staining, showing higher expression of ANAPC13 and CLTCL1 proteins in lesions representative of pure DCIS (left) and *in situ* component of DCIS-IDC (right). Level of background or nonspecific staining, sharpness, intensity, and localization were considered in the IHC analysis. Antibody specificity determined by Western blot for ANAPC13 (19 kDa) and for CLTCL1 (192 kDa) (right panel). Images acquired from ScanScope XT scanner (Aperio). Original magnifications, $\times 200$. DCIS indicates ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma; MCF7 and SKBR-3, human breast cancer cell lines.

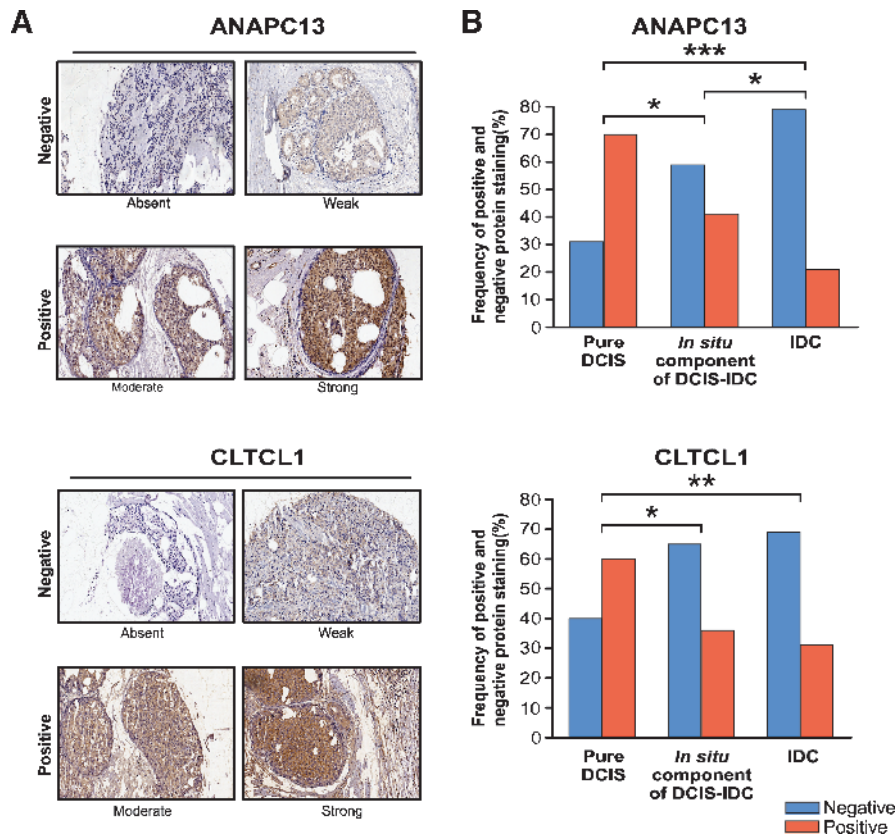


Figure 3. Frequency of positive and negative protein staining of ANAPC13 and CLTCL1 along DC progression. (A) Immunohistochemical analysis of ANAPC13 and CLTCL1, showing examples of the immunostaining pattern categorized as negative (absent and weak staining) and positive (moderate and strong staining). For ANAPC13, strong staining was only observed in DCIS lesions. Images acquired from ScanScope XT scanner (Aperio). (B) Graph bars representing the frequency of positive and negative protein staining of ANAPC13 and CLTCL1 in pure DCIS, *in situ* component of DCIS-IDC, and IDC lesions, respectively. DC indicates ductal carcinoma; DCIS, ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma; IDC, invasive ductal carcinoma. $*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$.

results suggest that the down-regulation of *ANAPC13* may be involved not only in early molecular alterations that precede the morphologic manifestation of invasion but also in late stages in the progression of epithelial cells of DC, whereas, down-regulation of *CLTCL1* seems to be an early event that anticipates the invasive phenotype and that occurs at a defined time during DC progression.

ANAPC13 and CLTCL1 as Prognostic Factors for Invasive Ductal Carcinoma

We next tested the prognostic potential of *ANAPC13* and *CLTCL1* by analyzing possible associations of these proteins with the clinicopathologic variables of the IDC samples. No statistically significant associations were observed between protein staining patterns and clinicopathologic variables (Table 3). Next, univariate analysis was performed to assess the association of cytoplasmic staining of *ANAPC13* and *CLTCL1* with overall and disease-free survival in patients with invasive breast carcinoma (Table W4) categorizing as negative, absent staining, and positive, weak, moderate, and strong staining. Overall and disease-free survival rates were higher among patients with positive cytoplasmic expression of *ANAPC13* (log-rank test, $P = .003$ and $P = .04$, respectively; Figure 4, A and B). These results strongly suggest the potential of *ANAPC13* as a favorable prognostic factor in IDC. According to the Cox regression univariate model, patients with negative *ANAPC13* cytoplasmic tumors had a two-fold higher risk of dying than patients with tumors positive for this protein (crude hazard ratio = 2.00, 95% confidence interval = 1.3-3.2). Multivariate analysis demonstrated that *ANAPC13* is an independent prognostic factor (hazard ratio = 2.09, 95% confidence interval = 1.3-3.4), reinforcing it as a promising molecular marker for IDC (Table W5).

Finally, we classified the IDC samples based on their molecular subtypes as luminal A ($n = 106$), luminal B ($n = 12$), $HER2^+$ ($n = 19$), basal-like ($n = 12$), and unclassified ($n = 19$) lesions (Tables W6 and W7) as defined in Materials and Methods. Only luminal A subtype showed a significant association between positive *ANAPC13* and the presence of three or less compromised lymph nodes ($P = .0158$). In addition, among luminal A samples, the overall survival rate was higher for patients with positive *ANAPC13* samples (log-rank test, $P = .004$; Figure 4C). No significant associations were found between *ANAPC13* staining categories and disease-free survival in luminal A cases (Figure 4D) as well as for overall and disease-free survival rates in the other molecular subtypes.

Mutation Screening in ANAPC13 Gene

Given that *ANAPC13* down-regulation seems to play an important role during DC progression, we evaluated whether protein interruption causing mutations in *ANAPC13* could lead to decreased expression during late stages of tumor progression. Thus, the three exons, two of them coding, and the exon/intron borders of *ANAPC13* were analyzed by DNA sequencing in 42 IDC samples. Seven alterations were found, but none of them were within the coding sequence indicating that mutation may not be the event that contributes to the decrease or absence of *ANAPC13* protein in breast tumor (Table W8 and Figure W1A).

Copy Relation of ANAPC13 Expression and Copy Number Alterations

We reasoned that decrease of *ANAPC13* could result in genomic instability during breast tumor progression. To test this hypothesis, we classified a group of 33 IDC samples based on their *ANAPC13* tran-

scriptional levels by RT-qPCR. Fourteen and 19 samples expressed low and high levels of *ANAPC13*, respectively ($P < .0001$; Figure 5A). Next, copy number alterations (CNAs) were assessed using genomic DNA from the same sample set. A statistically significant association between low levels of *ANAPC13* and increased numbers of CNAs was observed ($P = .048$; Figure 5B). Breast tumor samples with low expression of this gene displayed 767 gains and 906 losses, whereas 355 gains and 377 losses were observed in the group of breast samples with high expression of *ANAPC13*. In these sample groups, no overrepresentation of any molecular subtypes was observed ($P = .36$; Table W9). Interestingly, the increased number of gains in samples expressing low levels of *ANAPC13* was mainly observed in the chromosomal regions where imbalances in breast tumor samples are frequently detected, such as gains at 1q (1q23.1-1q32.1), 8q, and 17q (17q24.2) [36] (Figure 5C).

We also used the aCGH data for checking whether the absence of *ANAPC13* protein in IDC samples could be a result of loss of *ANAPC13* chromosomal region. No *ANAPC13* losses were detected suggesting that other mechanisms are involved in the down-regulation of *ANAPC13* in breast tumor (Figure W1B).

Discussion

Ductal breast cancer progression is a multistep process in which continuous accumulation of molecular abnormalities leads to a series of histopathologic stages, namely flat epithelial atypia followed by atypical ductal hyperplasia, DCIS, and IDC, which may lead to metastatic disease and death [8,9]. In a cell-based microarray experiment, we observed that most of the molecular alterations in epithelial cells during breast cancer progression occur between cells of two morphologically similar lesions, pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC lesions, rather than between the *in situ* component of DCIS-IDC and IDC lesions, suggesting that molecular changes occur before the appearance of morphologic modifications [10]. By identifying changes in gene expression that precede DC invasion, we reasoned that is possible to unveil potential markers for clinical application, especially concerning the risk of progression of both pure DCIS and early-stage IDC lesions. Therefore, we examined changes in gene expression between pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC. We assessed eight genes, for which commercial antibodies are available, permitting the use of FFPE tissues for validation by IHC. That is especially important for pure DCIS lesions, which owing to their tiny size, are often entirely used for diagnosis proposals. This fact has hindered the identification of biomarkers for progression of pure DCIS, using frozen tissues for RNA-based analysis, considering the importance of assessing large and independent set of samples in the validation process. In addition, the low-quality RNA obtained from FFPE tissues can introduce bias in relative gene expression even with the improvements in the protocols for isolating RNA from FFPE tissue for assessing transcriptional data [37,38].

Among the eight genes tested, two, *ANAPC13* and *CLTCL1*, presented the potential to play an important role in DC progression. Both demonstrated decreased expression at both the mRNA and protein levels in the *in situ* component of DCIS-IDC lesions.

Differences in protein expression levels between the two types of preinvasive lesions, pure DCIS and the *in situ* component of DCIS-IDC, have also been reported by others [39,40]. ER, PR, and EGFR have been found to be more highly expressed in pure DCIS compared to *in situ* component of DCIS-IDC [40,41], reinforcing the existence of molecular differences between tumor cells from these two lesion types with similar morphology.

Table 3. ANAPC13 and CLTCL1 Expression (Cytoplasmic Staining) in a Tissue Microarray Composed IDC Samples.

Variable	Category	ANAPC13, n (%)*		P	CLTCL1, n (%)*		P
		Negative	Positive		Negative	Positive	
Lymph node metastasis	≤3	34 (32.00)	72 (68.00)	.09	30 (28.60)	75 (71.40)	.08
	>3	23 (46.00)	27 (54.00)		8 (16.00)	42 (84.00)	
<i>In situ</i> lesion	Absent	40 (50.00)	40 (50.00)	.24	19 (24.40)	59 (75.60)	.36
	Present	10 (37.00)	17 (63.00)		9 (33.30)	18 (67.70)	
ER status	Negative	24 (40.70)	35 (59.30)	.60	14 (23.30)	46 (76.70)	.83
	Positive	44 (36.70)	76 (63.30)		29 (24.80)	88 (75.20)	
PR status	Negative	42 (42.90)	56 (57.10)	.38	25 (25.00)	75 (75.00)	.83
	Positive	28 (36.40)	49 (63.60)		17 (23.60)	55 (76.40)	
HER2 status	Negative	54 (38.00)	88 (62.00)	.64	35 (25.00)	103 (75.00)	.89
	Positive	14 (42.00)	19 (58.00)		8 (24.00)	25 (76.00)	
EGFR	Negative	53 (38.00)	87 (62.00)	.90	32 (23.00)	106 (77.00)	.26
	Positive	11 (37.00)	19 (63.00)		9 (33.00)	18 (67.00)	
CK5/6	Negative	51 (39.00)	79 (61.00)	.99	27 (22.00)	98 (78.00)	.06
	Positive	17 (39.00)	27 (61.00)		16 (36.00)	29 (64.00)	
Nuclear grade	1	1 (50.00)	1 (50.00)	.96	1 (50.00)	1 (50.00)	.77
	2	19 (44.20)	24 (55.80)		11 (28.20)	28 (71.80)	
	3	48 (46.20)	56 (53.80)		28 (27.20)	75 (72.80)	
SBR grade	1	13 (44.80)	16 (55.20)	.98	9 (33.30)	18 (66.70)	.70
	2	40 (46.50)	46 (53.50)		24 (28.20)	61 (71.80)	
	3	15 (46.90)	17 (53.10)		7 (23.30)	23 (76.70)	
Clinical stage	I + II	34 (44.00)	44 (56.00)	.68	26 (30.00)	62 (70.00)	.08
	III + IV	34 (40.00)	50 (60.00)		15 (18.00)	67 (82.00)	

CK, cytokeratin; EGFR, epidermal growth factor receptor; ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; IDC, invasive ductal carcinoma; PR, progesterone receptor. *Percentage considering number of cases with complete information.

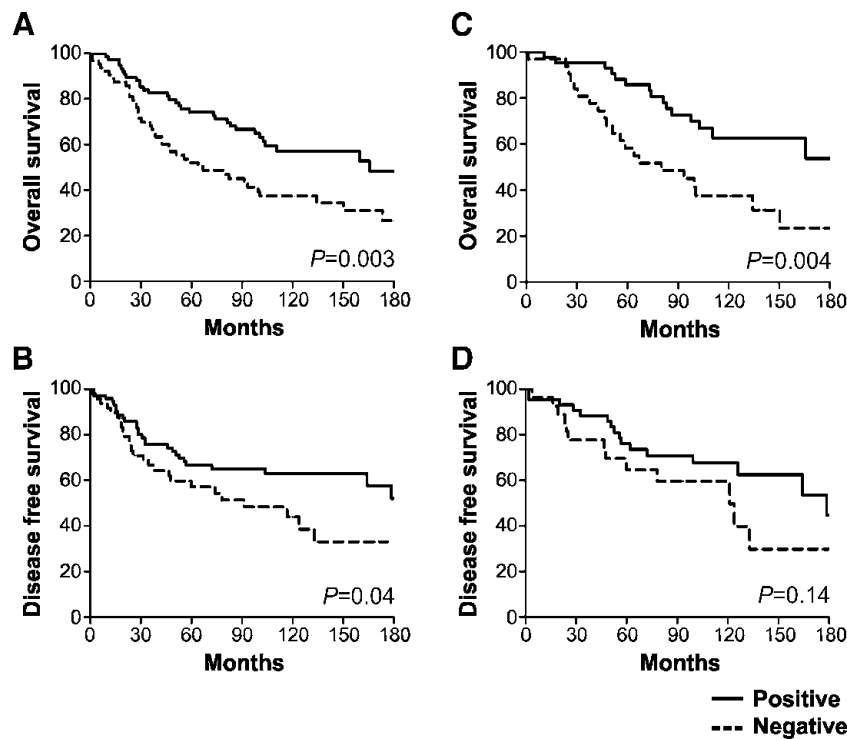


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves based on ANAPC13 cytoplasmic staining. The overall survival time was defined as the interval between the beginning of treatment (surgery) and the date of death or the last information for censored observations. The disease-free interval was measured from the date of the treatment to the date when recurrence was diagnosed. The follow-up period varied from 1 to 180 months (73.8 ± 39.8, mean ± SD). A total of 64 recurrences were observed, and the time of these recurrences varied from 1 to 176.2 months (34.5 ± 38.6, mean ± SD). Overall survival (A) and disease-free survival (B) in patients positive or negative to ANAPC13 cytoplasmic staining with invasive ductal carcinoma. Overall survival (C) and disease-free survival (D) in luminal A group positive or negative to ANAPC13 cytoplasmic staining.

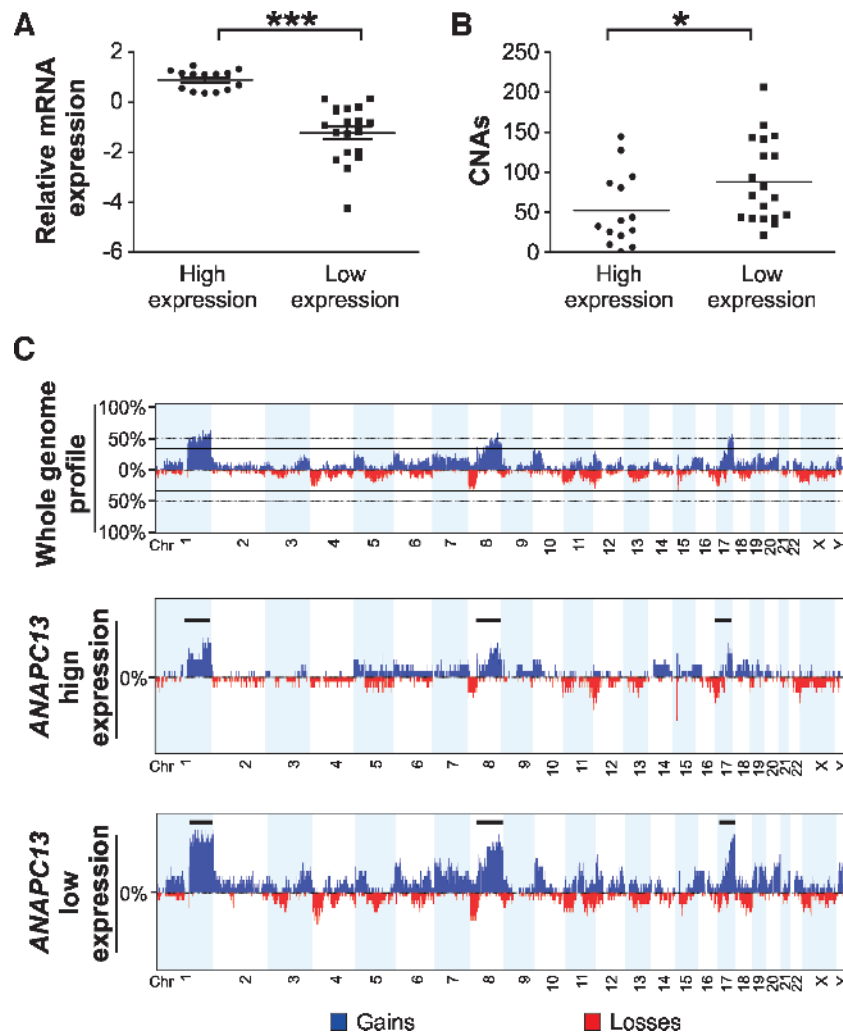


Figure 5. Correspondence between *ANAPC13* expression and genomic instability in invasive ductal carcinoma. (A) Relative mRNA expression in IDC cases with high and low expression of *ANAPC13* by RT-qPCR. (B) Number of CNAs in IDC samples with high and low expression of *ANAPC13*. (C) The x axis corresponds to the genomic region from chromosomes 1 to 22, X and Y, and the y axis represents the percentage of gains (plotted in blue above the 0% baseline) and losses (plotted in red below the 0% baseline) in all selected samples at the specified location in genome. The upper panel shows genome-wide CNAs (gains and losses) in 33 breast tumors. The middle and lower panels show frequency plots of breast tumors grouped according to *ANAPC13* expression status (high and low expression, respectively). Breast tumors with low *ANAPC13* expression show a distinctive pattern of genomic alterations mainly characterized by an increased frequency of gains at 1q (1q23.1-1q32.1), 8q, and 17q (17q24.2) (represented by black bars). Images obtained from Nexus copy number 5.1 software (Biodiscovery). Chr indicates chromosome; CNAs, copy number alterations. * $P < .05$, *** $P < .001$.

The fact that *CLTCL1* expression decreases at the mRNA and protein levels in the earliest stages of tumor progression, when the cells still exhibit a preinvasive phenotype, but shows no further changes in expression during late stages of tumor progression highlights the potential of this gene as a biomarker for risk of progression of pure preinvasive lesions. Modulation of the expression of clathrins and/or clathrin adaptors seems to have a role in tumorigenesis and cell proliferation [42]. Although additional evidence of *CLTCL1* importance in the context of DCIS progression is necessary, the current analysis is the first study, to our knowledge, that associates *CLTCL1* with breast tumors.

The expression of *ANAPC13* decreased progressively at both the mRNA and protein levels during the course of tumor progression. Multivariate analyses associated positive *ANAPC13* categories of breast tumors with higher rates of survival, suggesting that the presence of *ANAPC13* may be a protective factor for patients with DC of the breast.

In overall survival, the protective effect of *ANAPC13* expression was especially clear in luminal A cases, defined as ER- and/or PR-positive and HER2-negative. Although they are thought to have a good prognosis, luminal A breast tumors are a heterogeneous group including patients with distinct clinical outcomes. Therefore, the importance of novel molecular markers able to stratify tumors for more efficient and individualized treatment is obvious [43,44], and *ANAPC13* may have an important role in the subclassification of luminal A cases.

On the basis of the role of *ANAPC13*, as a subunit of APC/C complex, which is responsible for destroying the cohesion between sister chromatids by the activation of a protein called cysteine-protease separase, enabling the mitotic spindle to pull sister chromatids to opposite spindle poles [45], we decided to investigate the relation between *ANAPC13* expression and CNAs. A statistically significant association was observed between a low expression of *ANAPC13* and higher

number of CNAs. Triple-negative tumors are more likely to present genetic instability, and this is especially apparent in the basal-like subtype [36]. We did not observe overrepresentation of any of the molecular subtypes in either the *ANAPC13* high- or low-expressing groups, indicating that down-regulation of *ANAPC13* expression is probably associated to increased chromosomal instability in breast tumors.

ANAPC13 down-regulation does not seem to be a reflection of truncated proteins generated by non-sense mutation or frameshift mutation because no alterations in breast tumor DNA were observed in the coding sequence of this gene. Other mechanisms that regulate transcriptional expression, such as epigenetic modifications or micro-RNA, might be involved in the decrease of mRNA and protein expression levels.

Much attention has been focused on understanding how epithelial cells can survive in a hypoxic, nutrient-deprived *in situ* niche and how that niche in turn promotes genetic instability and triggers an invasive phenotype by selecting neoplastic cells with invasive capacity [14,46,47]. Although the current study demonstrates that tumors expressing low levels of *ANAPC13* harbored higher number of CNAs, the precise role played by *ANAPC13* in genomic instability remains to be addressed. A more thorough investigation of *ANAPC13* function in the context of breast cancer, especially its function in genomic instability, may contribute to the understanding of mechanisms underlying the progression of DC.

Together, the results presented in this study strongly suggest that the investigation of the molecular differences between epithelial tumor cells from pure DCIS and from the *in situ* component of DCIS-IDC, which are representative of the first molecular alterations that precede morphologic modifications, can result in the identification of novel molecular markers involved in the progression of ductal carcinoma of the breast.

Acknowledgments

The authors thank the Biobank, Centro Internacional de Pesquisa e Ensino the International Center of Research and Education at the A.C. Camargo Hospital. The authors thank Ricardo Renzo Brentani for critically reviewing this article.

References

- Berman HK, Gauthier ML, and Tlsty TD (2010). Premalignant breast neoplasia: a paradigm of interlesional and intralesional molecular heterogeneity and its biological and clinical ramifications. *Cancer Prev Res (Phila)* **3**, 579–587.
- Lagios MD (1995). Heterogeneity of duct carcinoma *in situ* (DCIS): relationship of grade and subtype analysis to local recurrence and risk of invasive transformation. *Cancer Lett* **90**, 97–102.
- Mokbel K and Cutuli B (2006). Heterogeneity of ductal carcinoma *in situ* and its effects on management. *Lancet Oncol* **7**, 756–765.
- Sgroi DC (2010). Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol* **5**, 193–221.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10869–10874.
- Bombonati A and Sgroi DC (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol* **223**, 307–317.
- Wellings SR and Jensen HM (1973). On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst* **50**, 1111–1118.
- Wellings SR, Jensen HM, and Marcum RG (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* **55**, 231–273.
- Castro NP, Osorio CA, Torres C, Bastos EP, Mourao-Neto M, Soares FA, Brentani HP, and Carraro DM (2008). Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* **10**, 5/R87.
- Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, et al. (2003). Gene expression of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5974–5979.
- Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, et al. (2006). Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas *in situ* and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* **66**, 5278–5286.
- Damonte P, Hodgson JG, Chen JQ, Young LJ, Cardiff RD, and Borowsky AD (2008). Mammary carcinoma behavior is programmed in the precancer stem cell. *Breast Cancer Res* **10**, 3/R50.
- Espina V and Liotta LA (2011). What is the malignant nature of human ductal carcinoma *in situ*? *Nat Rev Cancer* **11**, 68–75.
- Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, and Sgroi DC (2009). Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* **11**, 1/R7.
- Hu M and Polyak K (2008). Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer* **44**, 2760–2765.
- Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, Richardson A, Violette S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, et al. (2008). Regulation of *in situ* to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* **13**, 394–406.
- Schnitt SJ (2009). The transition from ductal carcinoma *in situ* to invasive breast cancer: the other side of the coin. *Breast Cancer Res* **11**, 1/101.
- Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, Ferreira EN, Torres CH, Katayama ML, Roela RA, Lyra EC, et al. (2009). Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *Int J Cancer* **125**, 2767–2777.
- Yoon HJ, Feoktistova A, Wolfe BA, Jennings JL, Link AJ, and Gould KL (2002). Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. *Curr Biol* **12**, 2048–2054.
- Peters JM (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell* **9**, 931–943.
- Liu SH, Towler MC, Chen E, Chen CY, Song W, Apodaca G, and Brodsky FM (2001). A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. *EMBO J* **20**, 272–284.
- Long KR, Trofatter JA, Ramesh V, McCormick MK, and Buckler AJ (1996). Cloning and characterization of a novel human clathrin heavy chain gene. *Genomics* **35**, 466–472.
- Hood FE and Royle SJ (2009). Functional equivalence of the clathrin heavy chains CHC17 and CHC22 in endocytosis and mitosis. *J Cell Sci* **122**, 2185–2190.
- Kedra D, Peyrard M, Fransson I, Collins JE, Dunham I, Roe BA, and Dumanski JP (1996). Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (*CLH-22*) from chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* **5**, 625–631.
- Royle SJ, Bright NA, and Lagnado L (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* **434**, 1152–1157.
- Calmon MF, Rodrigues RV, Kaneto CM, Moura RP, Silva SD, Mota LD, Pinheiro DG, Torres C, de Carvalho AF, Cury PM, et al. (2009). Epigenetic silencing of CRABP2 and MXI in head and neck tumors. *Neoplasia* **11**, 1329–1339.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, et al. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* **134**, 48–72.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 118–145.
- Khramtsov AI, Khramtsov MT, Tretiakova M, Huo D, Olapade OI, and Goss KH (2010). Wnt/catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* **176**, 2911–2920.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.

- [32] Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, 2002–2007.
- [33] Allred DC, Harvey JM, Berardo M, and Clark GM (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* **11**, 155–168.
- [34] Ricca TI, Liang G, Suenaga AP, Han SW, Jones PA, and Jasiulionis MG (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression associated with gene demethylation confers anoikis resistance in early phases of melanocyte malignant transformation. *Transl Oncol* **2**, 329–340.
- [35] Ferreira EN, Maschietto M, Silva SD, Brentani H, and Carraro DM (2010). Evaluation of quantitative RT-PCR using nonamplified and amplified RNA. *Diagn Mol Pathol* **19**, 45–53.
- [36] Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, Borresen-Dale AL, and Pollack JR (2006). Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 1033–1040.
- [37] Benchekroun M, DeGraw J, Gao J, Sun L, von Boguslawsky K, Leminen A, Andersson LC, and Heiskala M (2004). Impact of fixative on recovery of mRNA from paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* **13**, 116–125.
- [38] Saraiva TF, Castro NP, Pineda PHB, Osório CABT, Camargo LP, Brentani HP, and Carraro DM (2006). Effects of oligo dT-T7 RNA primer in RNA amplification from paraffin-embedded tissue for microarray experiments. *Appl Cancer Res* **26**, 14–20.
- [39] Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJ, and van de Vijver MJ (2008). Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Br J Cancer* **98**, 137–142.
- [40] Steinman S, Wang J, Bourne P, Yang Q, and Tang P (2007). Expression of cytokeratin markers, ER- α , PR, HER-2/*neu*, and EGFR in pure ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and DCIS with co-existing invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast. *Ann Clin Lab Sci* **37**, 127–134.
- [41] Schorr MC, Pedrini JL, Savaris RF, and Zettler CG (2010). Are the pure *in situ* breast ductal carcinomas and those associated with invasive carcinoma the same? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**, 51–54.
- [42] Pyrzynska B, Pilecka I, and Miaczynska M (2009). Endocytic proteins in the regulation of nuclear signaling, transcription and tumorigenesis. *Mol Oncol* **3**, 321–338.
- [43] Di CS and Baselga J (2010). Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 139–147.
- [44] Loi S (2008). Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers: what have we learnt? *Eur J Cancer* **44**, 2813–2818.
- [45] Nasmyth K (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **35**, 673–745.
- [46] Bindra RS and Glazer PM (2005). Genetic instability and the tumor micro-environment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res* **569**, 75–85.
- [47] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, and White E (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 961–967.

Table W1. Distribution of Breast Cancer Cases According to Clinicopathologic Variables.

Variable	Category	TMA 1 (Pure DCIS and DCIS-IDC), <i>n</i> (%) [*]	TMA 2 (Invasive Samples), <i>n</i> (%) [*]
Histologic type of DCIS	Pure DCIS	44 (55.00)	NA
	<i>In situ</i> component of DCIS-IDC	36 (45.00)	27 (14.40)
	IDC	NA	160 (85.60)
Histologic subtype	Non-comedo	62 (82.70)	ND
	Comedo	13 (17.30)	ND
Nuclear grade	1	4 (5.60)	2 (1.30)
	2	33 (46.50)	43 (28.30)
	3	34 (47.90)	107 (70.40)
Histologic grade	Non-high grade	34 (51.5)	ND
	High grade	32 (48.5)	ND
SBR grade	1	ND	29 (19.30)
	2	ND	89 (59.30)
	3	ND	32 (21.30)
Clinical stage	I + II	ND	78 (48.00)
	III + IV	ND	84 (52.00)
Estrogen receptor status	Negative	22 (32.80)	61 (33.20)
	Positive	45 (67.20)	123 (66.80)
Progesterone status	Negative	31 (46.27)	103 (57.20)
	Positive	36 (53.73)	77 (42.80)
HER2 status	Negative	11 (16.70)	145 (83.30)
	Positive	55 (83.30)	29 (16.70)
CK5/6	Negative	ND	130 (73.00)
	Positive	ND	48 (27.00)
EGFR	Negative	ND	144 (82.80)
	Positive	ND	30 (17.20)
Recurrence	No	ND	75 (52.82)
	Yes	ND	67 (47.18)
Lymph node metastasis	≤3	ND	108 (67.00)
	>3	ND	53 (33.00)
Adjuvant chemotherapy	No	ND	77 (54.2)
	Yes	ND	65 (45.8)
Radiotherapy	No	ND	37 (26.0)
	Yes	ND	105 (74.0)
Hormone therapy	No	ND	75 (52.8)
	Yes	ND	67 (47.2)

CK, cytokeratin; DCIS, ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; IDC, invasive ductal carcinoma; NA, not applicable; ND, not determined; SBR grade, Scarff-Bloom-Richardson grade; TMA, tissue microarray.

^{*}Percentage considering the number of cases with complete information.

Table W2. Genes and Primer Sequences Used in RT-qPCR and Mutation Screening Analysis.

RT-qPCR Analysis			Mutation Analysis	
Gene Symbol	Annotation	Primer Sequences (5'-3')	Primer Sequence	Exons Analyzed
<i>ADFP</i> (GenBank: NM_001122.2)	Adipose differentiation-related protein	Forward: GATACTGATGAGTCCCCTG Reverse: GGTACACCTTGGATGTTGG	Forward: CCAGCCTCTGTAGTCGG Reverse: GGGACACGTCTTATCAATTTTC	1
<i>ANAPC13</i> (GenBank: NM_015391.3)	Anaphase-promoting complex subunit 13	Forward: GATTGATGATGCTTGGCG Reverse: GTAAGGCTAAGTCTGTCC	Forward: GTACGGTGCGGATGGTG Reverse: CAGGGCACACTGATTATCTTG	1
<i>ARHGAP19</i> (GenBank: NM_032900)	Rho GTPase activating protein 19	Forward: CAAGATTGAAGTGGTCTGAAG Reverse: CAAGATTGAAGTGGTCTGAAG	Forward: GGAGAGAGAACTGTGATC Reverse: GTTAGAGAATTCCACAGCTTTG	2
<i>CLTCL1</i> (GenBank: NM_01835.3)	Clathrin, heavy chain-like 1	Forward: GATGGGCATGAATGAGAC Reverse: CGAAGTTGGGAGCAGA	Forward: CCTAGGAAGTCCACAAGC Reverse: GCCTTTCCCTCTCATA	3
<i>CPNE3</i> (GenBank: 003909.3)	Copine III	Forward: CGAAGTTGGGAGCAGAG Reverse: CTGCCAAGACACACTGAG	Forward: GCTGTCAAAGTTTAACACC Reverse: GGATGTATCTGGATTATAGG	3
<i>IMMT</i> (GenBank: 006839.2)	Inner membrane protein, mitochondrial	Forward: GATCACTTGCAGATGTCC Reverse: GACTGAGACGACGAAATTG		
<i>NGDN</i> (GenBank: NM_001042635.1)	Neuroguidin, EIF4E binding protein	Forward: CGTTTTAAGCCTCATCCCAG Reverse: CATCTTCTGCTTCATCTTCTC		
<i>PLAS2</i> (GenBank: NM_0046712)	Protein inhibitor of activated STAT2	Forward: GACCGAAGAAAGGCTATG Reverse: GTCACGAAACAAGGCTTAC		
<i>ACTB</i> (GenBank: MN_001101.3)	Actin beta	Forward: GCACCCAGCACAAATGAAG Reverse: CTTGCTGATCCACATCTGC		
<i>BCR</i> (GenBank: NM_004327)	Breakpoint cluster region	Forward: CCTTCGACGTCATAACAAGGAT Reverse: CCTGCGATGGCGTTCAC		
<i>GAPDH</i> (GenBank: AJ00531)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Forward: GAAGGTGAAGGTCGGA Reverse: GGGTCATTGATGGCAAC		
<i>HPRT1</i> (GenBank: NM_000194.2)	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Forward: CCCACGAAGTGTGGATATAAGC Reverse: GGGCATATCCTACAACAACTTGTC		
<i>RPLP0</i> (GenBank: NM_001002)	Hydrogenase expression/formation	Forward: GGAGACGGATTACACCTTC Reverse: CTTCAACCTTAGCTGGGG		

Table W3. ADFP, ANAPC13, ARHGAP19 and CLTCL1 Expression in a Tissue Microarray Composed of *In Situ* Lesions.

Protein	IHC Analysis	Histologic Type of DCIS		P
		Pure DCIS	<i>In Situ</i> Component of DCIS-IDC	
ADFP (cytoplasmic staining) (%)*	Negative	26 (68.40)	22 (73.30)	.28
	Positive	12 (31.60)	8 (26.70)	
ANAPC13 (nuclear staining) (%)*	Negative	13 (35.10)	10 (38.40)	.78
	Positive	24 (64.90)	16 (61.60)	
ANAPC13 (cytoplasmic staining) (%)*	Negative	11 (30.50)	16 (59.20)	.02 [†]
	Positive	25 (69.50)	11 (40.80)	
ARHGAP19 (nuclear staining) (%)*	Negative	25 (71.40)	14 (50.00)	.08
	Positive	10 (28.60)	14 (50.00)	
ARHGAP19 (cytoplasmic staining) (%)*	Negative	11 (31.40)	8 (28.60)	.80
	Positive	24 (68.60)	20 (71.40)	
CLTCL1 (cytoplasmic staining) (%)*	Negative	14 (40.00)	20 (64.50)	.04 [†]
	Positive	21 (60.00)	11 (35.50)	

DCIS indicates ductal carcinoma *in situ*; DCIS-IDC, ductal carcinoma *in situ* with coexisting invasive ductal carcinoma.

*Percentage considering the number of cases with complete information.

[†]P < .05.

Table W4. Association between Overall and Disease-Free Survival with ANAPC13 Cytoplasmic Expression.

Variable	Category	ANAPC13 (%)	
		Negative	Positive
Overall survival	5 years	50.4	73.0
	10 years	34.9	55.9
	15 years	21.4	33.8
Disease-free survival	5 years	51.8	63.2
	10 years	40.4	61.7
	15 years	31.4	50.8

Table W5. Independent Prognostic Factors According to the Cox Regression Model.

Variable	Category	Crude HR (95% IC)*	HR (95% IC)* Multivariate Analysis
SBR grade	1	1.0	1.0
	2	2.58 (1.2-5.3)	2.42 (1.1-5.2)
	3	3.60 (1.6-8.0)	4.29 (1.8-10.1)
T stage	T1 + T2	1.0	1.0
	T3 + T4	2.50 (1.5-4.1)	2.26 (1.3-3.9)
M stage	0	1.0	1.0
	1	5.77 (3.2-10.2)	4.11 (2.2-7.7)
ANAPC13 (cytoplasmic staining)	Positive	1.0	1.0
	Negative	2.00 (1.3-3.2)	2.09 (1.3-3.4)

HR indicates hazard ratio; M, metastasis; SBR grade, Scarff-Bloom-Richardson grade; T, tumor.
*Risks for death and 95% confidence interval.

Table W6. Association between ANAPC13 Cytoplasmic Staining and Clinicopathologic Variables in IDC Cases Classified According to the Molecular Classification (Luminal A and B).

Clinicopathologic Variable	Category	Luminal A		P	Luminal B		P
		Negative for ANAPC13 (%)*	Positive for ANAPC13 (%)*		Negative for ANAPC13 (%)*	Positive for ANAPC13 (%)*	
Lymph node metastasis	≤3	17 (28.30)	43 (71.70)	.01 [†]	1 (25.00)	3 (75.00)	>.999
	>3	14 (56.00)	11 (44.00)		1 (33.30)	2 (66.70)	
Nuclear grade	1	1 (100.00)	0 (0.00)	NA	0 (0.00)	0 (0.00)	NA
	2	7 (35.00)	13 (65.00)		0 (0.00)	2 (100.00)	
	3	24 (41.40)	34 (58.60)		2 (50.00)	2 (50.00)	
<i>In situ</i> lesion	absent	18 (45.00)	22 (55.00)	.76	1 (50.00)	1 (50.00)	NA
	present	7 (50.00)	7 (50.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	
SBR grade	1	7 (43.70)	9 (56.30)	.22	0 (0.00)	1 (100.00)	NA
	2	21 (47.70)	23 (52.30)		2 (50.00)	2 (50.00)	
	3	4 (23.50)	13 (76.50)		0 (0.00)	1 (100.00)	
Clinical stage	I + II	19 (40.00)	29 (60.00)	.85	2 (67.00)	1 (33.00)	.52
	III + IV	17 (38.00)	28 (62.00)		3 (33.00)	6 (67.00)	

IDC indicates invasive ductal carcinoma; NA, not applicable; SBR grade, Scarff-Bloom-Richardson grade.

*Percentage of cases with complete information.

[†]P < .05.

Table W7. Association between ANAPC13 Cytoplasmic Staining and Clinicopathologic Variables in IDC Cases Classified According to the Molecular Classification (HER2*, Basal-like, and Unclassified).

Clinicopathologic Variable	Category	HER2*		P	Basal-like		P	Unclassified		P
		Negative for ANAPC13 (%)*	Positive for ANAPC13 (%)*		Negative for ANAPC13 (%)*	Positive for ANAPC13 (%)*		Negative for ANAPC13 (%)*	Positive for ANAPC13 (%)*	
Lymph node metastasis	≤3	6 (50.00)	6 (50.00)	.31	3 (43.00)	4 (57.00)	NA	2 (20.00)	8 (80.00)	.06
	>3	1 (16.70)	5 (83.30)		0 (0.00)	2 (100.00)		5 (71.00)	2 (29.00)	
Nuclear grade	1	3 (50.00)	3 (50.00)	NA	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	1 (50.00)	1 (50.00)	.20
	2	6 (46.20)	7 (53.80)		1 (50.00)	1 (50.00)		1 (33.00)	2 (67.00)	
	3	0 (0.00)	0 (0.00)		3 (33.00)	6 (67.00)		7 (47.00)	8 (53.00)	
<i>In situ</i> lesion	absent	6 (50.00)	6 (50.00)	>.999	2 (67.00)	1 (33.00)	>.999	4 (44.00)	5 (56.00)	>.999
	present	1 (50.00)	1 (50.00)		1 (50.00)	1 (50.00)		1 (50.00)	1 (50.00)	
SBR grade	1	3 (75.00)	1 (25.00)	.37	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	1 (25.00)	3 (75.00)	.17
	2	3 (37.5)	5 (62.50)		2 (29.00)	5 (71.00)		7 (64.00)	4 (36.00)	
	3	2 (33.00)	4 (66.70)		2 (50.00)	2 (50.00)		1 (20.00)	4 (80.00)	
Clinical stage	I + II	4 (44.00)	5 (56.00)	>.999	1 (33.00)	2 (67.00)	>.999	7 (70.00)	3 (30.00)	.30
	III + IV	3 (43.00)	4 (57.00)		3 (43.00)	4 (57.00)		2 (33.00)	4 (67.00)	

IDC indicates invasive ductal carcinoma; NA, not applicable; SBR grade, Scarff-Bloom-Richardson grade.

*Percentage considering the number of cases with complete information.

Table W8. Genomic Alterations in *ANAPC13*.

Genomic Alteration	mRNA Region	Genotype	Frequency <i>n</i> = 42 (%)
c.-704G>C	5'UTR	Homozygous	27 (64.2%)
		Heterozygous	10 (23.8%)
c.-702_700 del GGG	5'UTR	Homozygous	36 (85.7%)
		Heterozygous	0 (0.0%)
c.-700 del G	5'UTR	Homozygous	1 (2.4%)
		Heterozygous	0 (0.0%)
c.-531 C>G	5'UTR	Homozygous	1 (2.4%)
		Heterozygous	0 (0.0%)
c.-662C>T	5'UTR	Homozygous	1 (2.4%)
		Heterozygous	0 (0%)
c.*3C>T	3'UTR	Homozygous	1 (2.4%)
		Heterozygous	0 (0%)
c.*193G>A	3'UTR	Homozygous	1 (2.4%)
		Heterozygous	0 (0.0%)

UTR indicates untranslated region.

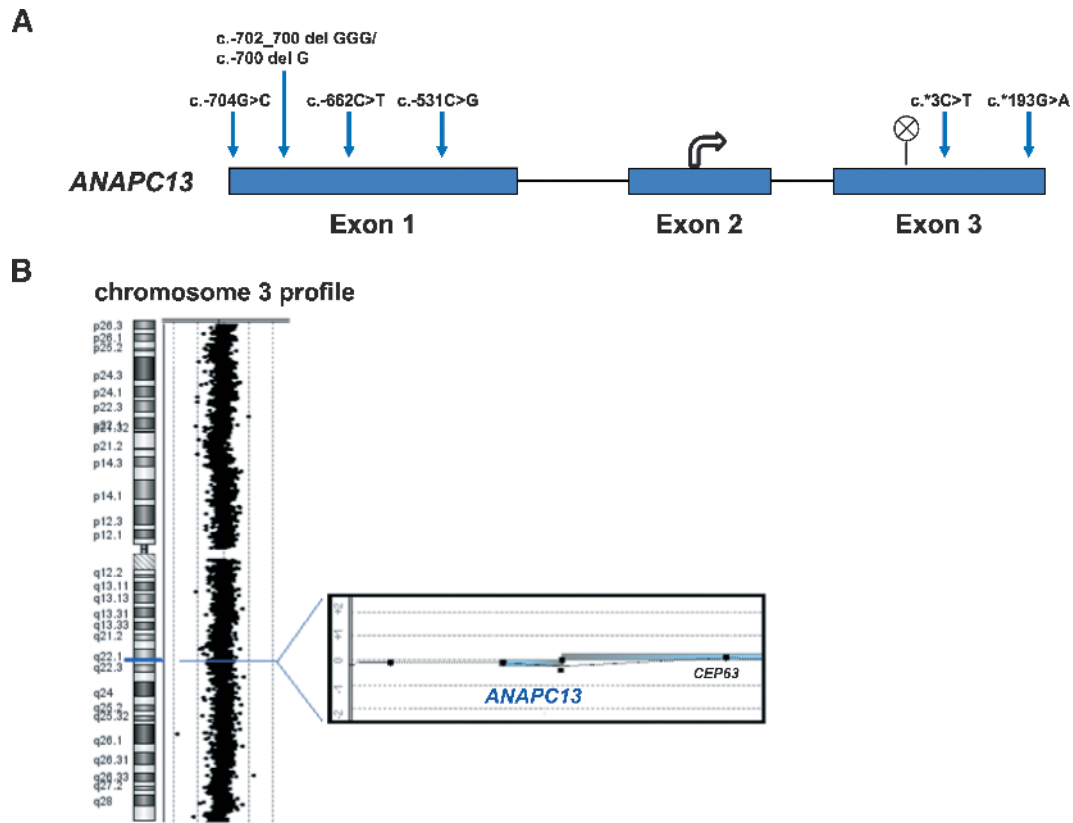


Figure W1. Mutation and deletion screening in *ANAPC13*. (A) Schematic representation of seven alterations found in *ANAPC13* genomic sequence. (B) Array CGH profile of a genomic segment at 3q22.2 from one sample of breast tumor. The figure depicts the location of the three oligoprobes mapped within the sequence of the gene *ANAPC13* (image extracted from the software Workbench DNA Analytics; Agilent Technologies). The values of log ratios around 0 showed that the investigated *ANAPC13* sequences had copy number equivalent to the whole genome of this tumor, suggesting that no deletions were observed.

Table W9. Analyses of *ANAPC13* Expression in Molecular Subtypes of Invasive Ductal Carcinoma.

Molecular Subtype	High Expression of <i>ANAPC13</i> (n%)	Low Expression of <i>ANAPC13</i> (n%)	P
Luminal A	6 (50.00)	6 (50.00)	.36
Luminal B	3 (75.00)	1 (25.00)	
HER2 ⁺	2 (28.60)	5 (72.40)	
Triple-negative	3 (30.00)	7 (70.00)	