

**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT, PI3K E
PROCESSO EMT PARA RISCO DE PROGRESSÃO DE
CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DE MAMA**

CYNTHIA APARECIDA BUENO DE TOLEDO OSÓRIO

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

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Osório, Cynthia Aparecida Bueno de Toledo

Identificação e validação de marcadores moleculares das vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT para risco de progressão de carcinoma ductal *in situ* de mama / Cynthia Aparecida Bueno de Toledo

Osório - São Paulo, 2013.

98p.

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/genética. 2. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 3. PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA. 4. PROTEÍNAS WNT. 5. ANÁLISES MICROARRAY. 6. IMUNOISTOQUÍMICA.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

ao meu marido e à minha filha, Márcio e Amanda, que sempre me apoiaram e incentivaram, com seu carinho, amor e compreensão. Razão de toda a minha vida. Estou muito feliz em poder partilhar esta conquista com vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, de tantas formas, a realizar este trabalho.

À minha orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pelas sugestões e críticas sempre construtivas, que acrescentaram tanto à minha vida profissional e pela amizade que tornou as dificuldades mais amenas.

Ao meu co-orientador, Dr. Fenando Augusto Soares, meu chefe e amigo, pelo incentivo e por me proporcionar tantas oportunidades de crescimento profissional.

À todos os meus amigos e colegas da equipe de patologistas do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital ACCamargo, Dr. Antonio Hugo J. F. M. Campos, Dr. Antonio Geraldo Nascimento, Dr. Clovis Antonio Lopes Pinto, Dr. Felipe D'Almeida, Dra. Isabela Werneck da Cunha, Dra. Louise de Brot Andrade, Dr. Marcos Araujo Chaves Junior, Dra. Maria Dirlei Ferreira S. Begnami, Dra. Mariana Macedo Petaccia, Dra. Stephania Martins Bezerra, Dr. Victor Piana de Andrade, pelo estímulo, compreensão e imensa colaboração, para que eu pudesse atingir este objetivo.

À Dra. Carolina Sens Abuázar, pela enorme colaboração e envolvimento, a quem respeito muito como colega de pós-graduação, por sua inteligência, capacidade de trabalho e senso de responsabilidade; uma grande amiga que ganhei no decorrer dos últimos anos de convivência.

À Dra. Elisa Napolitano e Ferreira, pela colaboração, atenção e por todas as sugestões muito pertinentes, que enriqueceram o meu estudo.

Ao Dr. Luiz Lima e Dra. Isabela Werneck da Cunha, pela colaboração na leitura do FISH.

Ao Dr. Wesley Pereira Andrade, pela colaboração com o raciocínio clínico.

À Suely Nonogaki, Juliano Jamprieto e José Ivanildo Neves, pela realização das reações imunistoquímicas e FISH.

Ao Biobanco do Hospital A.C. Camargo e Banco de macromoléculas, especialmente à Louise Mota.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, em especial ao Carlos Ferreira Nascimento e Severino Ferreira.

A todos os colegas do CIPE, em especial à Elisa Ferreira Napolitano e Vanina Elias.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial à Suely Francisco.

Ao SAME, principalmente ao Dr. Humberto Torloni e Dna. Hirde Contesini.

Aos funcionários da Pós-graduação, especialmente à Ana Maria Kuninari, Luciana Costa Pitombeira Castelano e Vanusa Barros Rodrigues de Oliveira, pela solicitude, educação e profissionalismo.

Aos meus pais, por me educarem e proporcionarem a oportunidade de estudar, sem medir esforços, mesmo em tempos difíceis.

Aos meus irmãos, familiares e amigos, por me acompanharem nesta jornada, sempre com palavras de incentivo.

À minha filha Amanda, pela alegria, juventude e amor, que alimentaram meus dias e me fortaleceram.

Ao meu marido Márcio, cuja paciência e carinho são infinitos. Esta conquista não seria possível sem a sua compreensão e cumplicidade.

RESUMO

Osório CABT. **Identificação e validação de marcadores moleculares das vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT para risco de progressão de carcinoma ductal *in situ* de mama.** São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma ductal da mama é o tipo histológico mais freqüente, sendo que o *in situ* (CDIS) representa uma neoplasia com incidência crescente, devido aos métodos de detecção precoce de lesões mamárias não palpáveis. Essa neoplasia da mama inclui um grupo heterogêneo de tumores pré-invasivos, com potencial maligno distinto, que podem progredir rapidamente para a forma invasiva, ou não apresentarem evolução, após um longo período da doença. Um estudo prévio (CASTRO et al. 2008) aplicou o conceito de divergência molecular em grupos de lesões que mimetizam a progressão do câncer de mama [epitélio normal (EN), carcinoma ductal *in situ* (CDIS) puro, componente *in situ* de lesão que coexiste com invasão (CDIS-CDI) e do carcinoma ductal invasivo (CDI)], utilizando as metodologias de microdissecção a laser e cDNA *microarray*. O padrão de expressão gênica do grupo de células epiteliais tumorais do componente *in situ* do CDIS-CDI é semelhante ao grupo de células tumorais do CDI e diferente do grupo de células CDIS puro, cujos aspectos morfológicos são semelhantes ao componente *in situ* do CDIS-CDI. Isso sugeriu que as modificações moleculares das células do componente *in situ* do CDIS-CDI, já estejam presentes antes da manifestação morfológica de invasão e que os genes diferentemente expressos entre os dois grupos de células de lesões pré-invasivas, sejam potenciais preditores de risco de progressão do CDIS puro. Assim, nós avaliamos 28 genes das vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT, previamente selecionados do estudo anterior (CASTRO et al. 2008) através de RT-PCR quantitativo (RT-qPCR), em células tumorais capturadas de amostras congeladas do CDIS puro e do componente *in situ* do CDIS-CDI. Esse trabalho confirmou a diferença de expressão em células epiteliais entre os dois grupos de lesões pré-invasivas, em 14 (70%) de 20 genes avaliados, que apresentaram dados

confiáveis nos ensaios de TLDA, sendo que 13 genes apresentaram maior expressão em CDIS puro, reforçando a observação de que a programação molecular dos primeiros estágios de transição de carcinoma in situ para invasivo é marcada predominantemente por redução da expressão gênica. A expressão citoplasmática da proteína de GRB10 apresentou maior frequência de positividade da marcação em lesões CDIS puro, confirmando os dados obtidos na análise de RNAm em um grupo completamente independente de amostras.

SUMMARY

Osório CABT. [**Identification and validation of molecular markers of WNT and PI3K signaling pathway and EMT process for the risk of progression of ductal carcinoma *in situ* of the breast**]. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Among breast tumors, ductal breast carcinoma is the most common histologic type. Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) has increasing incidence, mainly due to early detection methods of non-palpable breast lesions. DCIS includes a heterogeneous group of pre-invasive tumors, with distinct malignant potential, which can either rapidly progress to the invasive form, or show no progression after a long period of surveillance. In a previous study from the group (CASTRO et al. 2008) based on the expression pattern of epithelial cells, using laser capture microdissection and cDNA microarray, the concept of molecular divergence was applied to groups of breast lesions which mimic the progression of breast cancer [cells from normal epithelium, cells from pure ductal carcinoma *in situ* (DCIS), cells from *in situ* component that coexists with invasive lesion (DCIS-IDC) and cells from invasive ductal carcinoma (IDC)]. The gene expression pattern of the cells from the *in situ* component of DCIS-IDC is more similar to the group of IDC tumor cells other than to the group of pure DCIS of cells, which presents higher similarity in terms of morphological features to the *in situ* component of DCIS-IDC. This suggests that the molecular changes of the cells from the *in situ* component of DCIS-IDC are already present before morphological manifestations of invasion and that the genes differentially expressed between the two groups of cells of pre-invasive lesions, are potential predictors of risk of progression of pure DCIS. Thus, we evaluated 28 previously selected genes of WNT signaling pathway, PI3K and EMT process (CASTRO et al. 2008) by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) in tumor cells captured from *in situ* lesions of pure DCIS and DCIS-IDC from frozen samples. This work confirmed the difference in expression of epithelial cells between the two groups of preinvasive lesions, in 14 (70%) of the 20 genes evaluated, by reliable TLDA assays. Most genes (13 genes)

showed higher expression in pure DCIS, reinforcing the observation that the molecular programming of the early stages of transition from *in situ* to invasive carcinoma is characterized predominantly by reduction of gene expression. Protein cytoplasmic expression of GRB10 showed a higher frequency of positive staining in pure DCIS lesions, confirming the data obtained by mRNA analysis in a completely independent group of samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura morfológica da mama feminina normal.....	4
Figura 2	Modelo clássico de progressão do carcinoma ductal de mama.....	16
Figura 3	Esquema de análise estatística comparando o perfil de expressão gênica e as características morfológicas entre os estágios que mimetizam a progressão do carcinoma ductal.....	18
Figura 4	Esquema da via de transdução de sinal associada ao processo de transição epitélio-mesênquima, PI3K e WNT.....	24
Figura 5	Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina. Células tumorais epiteliais capturadas de lesões CDIS puras, componente <i>in situ</i> do CDIS-CDI e CDI.....	31
Figura 6	Corrida de RNA total e amplificado no equipamento <i>Bioanalyser</i>	33
Figura 7	Representação da placa matriz do ensaio TLDA (formato 384) contendo 377 poços para ensaios exclusivos e 7 poços para controles.....	34
Figura 8	Demonstração gráfica da análise do gene e o <i>cicle quantification</i>	35
Figura 9	Fluxograma demonstrativo do delineamento experimental do estudo.....	37

Figura 10	Esquema demonstrando a montagem do bloco do <i>tissue microarray</i> a partir do bloco doador e a lâmina de histologia para a análise.....	38
Figura 11	Lâmina de imunistoquímica demonstrando a representação dos <i>cores</i> de cada caso, em duplicata.....	38
Figura 12	Gráfico dos genes validados por RT-qPCR através do sistema TLDA, com valores de expressão gênica calculados com logaritmo na base 2, concordantes com a metodologia de <i>cDNA microarray</i>	46
Figura 13	Demonstração da especificidade do anticorpo pela proteína GRB10 através do ensaio de Western Blot.....	50
Figura 14	Expressão proteica de GRB10 em células epiteliais do parênquima mamário normal.....	54
Figura 15	Expressão proteica de GRB10 em CDIS puro e no componente <i>in situ</i> de CDIS/CDI.....	56
Figura 16	Expressão de GRB10 ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama.....	59
Figura 17	Expressão proteica de GRB10 em CDI (amostras dos TMAs 2 e 3).....	62
Figura 18	Curvas de Kaplan-Meier para cálculo de sobrevida.....	66
Figura 19	Esquema que demonstra o <i>feedback</i> negativo de GRB10, os receptores de insulina e a sinalização de PI3K-AKT.....	72
Figura 20	GRB10 e GRB14 inibindo os receptores de insulina que ativam PI3K-AKT.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Graus de estadiamento em câncer de mama, de acordo com a classificação de TNM.....	7
Quadro 2	Características morfológicas do CDIS de acordo com o grau histológico.....	9
Quadro 3	Características clínico-patológicas dos casos selecionados para a identificação por RT-qPCR com ensaio TLDA.....	29
Quadro 4	Anticorpos utilizados para as reações imunoistoquímicas, clonalidade, diluições e marcas.....	41
Quadro 5	Anticorpos utilizados, tecido controle normal e tumoral e localização subcelular.....	41
Quadro 6	Descrição dos genes com dados de expressão concordantes entre RT-qPCR e cDNA <i>microarray</i> , escolhidos para a avaliação por IIQ.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de escore de Allred para avaliação de expressão nuclear..	39
Tabela 2	Lista dos 28 genes avaliados pelo sistema de detecção TLDA...	45
Tabela 3	Expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10, MAPK8, INPP1 e EDN1 em um TMA composto por lesões de carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS) puro e componente <i>in situ</i> associado ao invasivo (CDIS-CDI).....	49
Tabela 4	Associação entre a expressão citoplasmática de GRB10 e as características clinicopatológicas no TMA (1) composto por lesões <i>in situ</i>	52
Tabela 5	Associação entre a expressão citoplasmática de GRB10 e os casos de CDIS puro sem segundo evento e com segundo evento.....	57
Tabela 6	Associação entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e as características clinicopatológicas nos TMAs (2 e 3) compostos por carcinoma ductal invasivo (CDI).....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcoSOG	Estudo clínico fase III (NCI)
z0011	
ADFP	Do inglês, <i>Adipocyte differentiation-related protein</i>
AEP	Atipia Epitelial Plana
ADH	Do inglês, <i>Atypical ductal hyperplasia</i>
ADH4	Do inglês, <i>Alcohol Dehydrogenase 4</i>
AF-2	Do inglês, <i>Transcription-activating function 2</i>
AG	Alto grau
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Do inglês, <i>Protein Kinase</i>
ANAPC13	Do inglês, <i>Anaphase promoting complex 13</i>
APC	Do inglês, <i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARHGAP19	Do inglês, <i>Rho GTPase activating protein 19</i>
ASCO	Do inglês, <i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATM	Do inglês, <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BPS	Do inglês, <i>Between the PH and SH2 domains</i>
BRCA1	Do inglês, <i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	Do inglês, <i>Breast cancer 2, early onset</i>
BRIP1	Do inglês, <i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
CAP	Do inglês, <i>College of American Pathologists</i>
CD	Carcinoma ductal
CD79a	Do inglês, <i>Immunoglobulin-associated alpha</i>
cDNA	Do inglês, <i>complementary DNA</i>
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CEP	Do inglês, <i>Chromosome centromere</i>

CHEK2	Do inglês, <i>Checkpoint kinase 2</i>
CK	Do inglês, <i>Cytokeratin</i>
CLTCL1	Do inglês, <i>Clathrin heavy polypeptide-like 1</i>
COL5A1	Do inglês, <i>Collagen, type V, alpha 1</i>
DCIS	Do inglês, <i>Ductal carcinoma in situ</i>
DLL1	Do inglês, <i>Delta like 1</i>
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
E- Caderina	Do inglês, <i>Epithelial cadherin</i>
EDN1	Do inglês, <i>Endothelin 1</i>
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EN	Epitélio normal
EMT	Do inglês, <i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
ErbB-2	Do inglês, <i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2</i>
FANCD2	Do inglês, <i>Fanconi Anemia, Complementation Group D2</i>
FEA	Do inglês, <i>Flat epithelial atypia</i>
FFEP	Do inglês, <i>Formaline fixed paraffin embedded</i>
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
GAPDH	Do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDAP1	Do inglês, <i>Ganglioside differentiation associated protein 1</i>
GIGYF1	Do inglês, <i>GRB10 interacting GYF protein 1</i>
GIGYF2	Do inglês, <i>GRB10 interacting GYF protein 2</i>
GRB	Do inglês, <i>Growth factor receptor-bound</i>
GRB10	Do inglês, <i>Growth factor receptor-bound protein 10</i>
GRB-IR	Do inglês, <i>Insulin receptor-binding protein Grb- IR</i>
GSK3β	Do inglês, <i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
HDA	Hiperplasia Ductal Atípica

H.E.	Hematoxilina eosina
HER2	Do inglês, <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HPRT1	Do inglês, <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HOXA1	Do inglês, <i>Homeobox protein HOX-A1</i>
HTR2A	Do inglês, <i>Hydroxytryptamine (Serotonin) Receptor 2A</i>
IDC	Do inglês, <i>Invasive ductal carcinoma</i>
IIQ	Imunoistoquímica
ILK	Do inglês, <i>Integrin-linked kinase</i>
INPP1	Do inglês, <i>Inositol polyphosphate-1-phosphatase</i>
IRBP	Do inglês, <i>Interphotoreceptor retinoid-binding protein</i>
IRS	Do inglês, <i>Insulin receptor substrate</i>
ITPKC	Do inglês, <i>Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C</i>
Jak-STAT	Do inglês, <i>Janus kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
JUNK	<i>JUN N-Terminal Kinase</i>
KI-67	Do inglês, <i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
LCM	Do inglês, <i>Laser Capture Microdissection</i>
LOX	Do inglês, <i>Lysyl oxidase</i>
LS	Linfonodo sentinela
LV	Lâmina de vias
MAPK	Do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK8	Do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinase 8 isoform</i>
MB	Membrana basal
MBP	Do inglês, <i>Myelin basic protein</i>

MCF-7	Do inglês, <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MEG1	Do inglês, <i>Maternally expressed gene1</i>
MEK1	Do inglês, <i>MAP kinase kinase isoforms MEK1</i>
mi	Microinvasão
MYB	Do inglês, <i>Myeloblastosis viral oncogene homolog</i>
MTA1	Do inglês, <i>Metastasis associated 1</i>
mTOR	Do inglês, <i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	Do inglês, <i>Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)1</i>
NAG	Não alto grau
NCAM2	Do inglês, <i>Neural cell adhesion molecule 2</i>
NP	Do inglês, <i>Nucleoside phosphorylase</i>
NPY	Do inglês, <i>Neuropeptide Y</i>
NRG2	Do inglês, <i>Neuregulin-2</i>
NST	Do inglês, <i>No special type</i>
OPN1LW	Do inglês, <i>Opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive</i>
ORESTES	Do inglês, <i>Open Reading Frame Expressed Sequence Tags</i>
P	Do inglês, <i>Proline-rich region</i>
P53	Do inglês, <i>Protein 53</i>
PALB2	Do inglês, <i>Partner and Localizer of BRCA2</i>
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
P14ARF	Do inglês, <i>Alternate reading frame product 14</i>
PAX4	Do inglês, <i>Paired box 4</i>
PAX6	Do inglês, <i>Paired box gene 6</i>
PH	Do inglês, <i>Pleckstrin-homology</i>
PI3K	Do inglês, <i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>
PRKACG	Do inglês, <i>Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma</i>
PRKM8	Do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>

PTEN	Do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
pTNM	(Sistema TNM de acordo com o exame patológico) pT = tumor primário; pN = linfonodo; pM = metástase (após exame patológico)
RA	Do inglês, <i>Ras-associating</i>
RAF	Do inglês, <i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>
RB	Do inglês, <i>Retinoblastoma gene</i>
RE	Receptor de estrógeno
RELN	Do inglês, <i>Reelin</i>
RH	Receptor hormonal
RNA	Do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_a	RNA amplificado
ROS	Do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
RP	Receptor de progesterona
RQCD1	Do inglês, <i>Required for cell differentiation 1 homologue</i>
RSS	Do inglês, <i>Recombination signal sequence</i>
RTK	Receptor de tirosina-quinase
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	Do inglês, <i>Quantitative real-time RT-PCR</i>
SAPK1	Do inglês, <i>Stress-activated protein kinase</i>
SBR	Scarff-Blom e Richardson
SH2	Do inglês, <i>C-terminal Src-homology-2 domain</i>
SNAIL	Do inglês, <i>Zinc finger protein SNAI1</i>
SPSS	Do inglês, <i>Statistical Package for Social Science</i>
SULF1	Sulfatase 1
STK11	Do inglês, <i>Serine/threonine kinase 11</i>
TMA	Do inglês, <i>Tissue microarray</i>

TGFβ1	Do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
TBX 2/3	Do inglês, <i>T-box transcription factor 2/3</i>
TCF/LEF	Do inglês, <i>T cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
TDLU	Do inglês, <i>Terminal ductal-lobular unit</i>
Tis	Tumor <i>in situ</i>
TLDA	Do inglês, <i>TaqMan® Low Density Arrays</i>
TN	Triplo negativo
TNM	(Sistema) T = tumor primário; N = linfonodo; M = metástase
TNFRSF8	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 8</i>
UICC	Do inglês, <i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF	Do inglês, <i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization</i>
WISP2	Do inglês, <i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>
WNT	Do inglês, <i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
WNT1	Do inglês, <i>Wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>
WNT10B	Do inglês, <i>Wingless-type MMTV integration site family, member 10B</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O Câncer de Mama	1
1.2	A Classificação dos Tumores Mamários	5
1.3	O Estadiamento do Carcinoma Mamário Invasivo	5
1.4	O Carcinoma Ductal in situ da Mama.....	7
1.5	A Classificação de Tumores Mamários baseada em Marcadores Moleculares..	9
1.5.1	A classificação de tumores mamários baseada em expressão proteica de RE e RP	9
1.5.2	A expressão proteica de RE e RP em CDI.....	10
1.5.3	A expressão proteica de RE e RP em CDIS.....	11
1.5.4	A classificação de tumores mamários baseada em HER2	11
1.5.5	O status HER2 em CDI.....	12
1.5.6	HER2 e o CDIS.....	13
1.5.7	Outros marcadores moleculares em CDI	13
1.5.8	Outros marcadores moleculares em CDIS	15
1.6	A Progressão do Carcinoma Ductal Da Mama	15
1.7	As Vias de Sinalização WNT, PI3K e Processo EMT (LV-01)	21
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.1.1	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Amostras	28
3.1.1	Critérios de inclusão.....	30
3.1.2	Critérios de exclusão	30
3.2	Microdissecção a Laser	30
3.3	Extração do RNA das Células Microdissecadas a Laser	32
3.4	Amplificação do RNA mensageiro (RNAm).....	32

3.5	Síntese de cDNA	33
3.6	Confirmação dos Dados de cDNA Microarray por RT-qPCR	33
3.6.1	Confirmação dos dados de cDNA microarray utilizando o ensaio TLDA	33
3.6.2	Cálculo de expressão relativa para os ensaios de RT-qPCR.....	36
3.6.3	Fluxograma com o delineamento experimental do estudo	36
3.7	Análise da Expressão Proteica de Candidatos Previamente Validados por RT-PCR	37
3.7.1	Construção dos tissue microarrays (TMAs).....	37
3.7.2	Caracterização dos TMAs 1, 2 e 3 com os marcadores imunoistoquímicos preditivos e prognósticos estabelecidos	39
3.8	Hibridação In Situ Fluorescente (FISH)	40
3.8.1	Critérios de avaliação das amostras pelo método de FISH.....	40
3.9	Reação Imunoistoquímica (IIQ) para a Validação dos Genes Seleccionados por RT-qPCR	41
3.9.1	Critérios para leitura das reações IIQs	42
3.10	Análise dos resultados.....	43
3.10.1	Análise dos resultados das reações de RT-qPCR.....	43
3.10.2	Análise dos resultados de Imunoistoquímica.....	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Seleção de Candidatos a Marcadores Moleculares para Progressão de carcinoma Ductal de Mama	44
4.1.1	Avaliação da expressão gênica em células epiteliais tumorais de CDIS puro e do componente in situ do CDIS-CDI	44
4.2	Resultados da IIQ dos Genes Seleccionados nas Amostras CDIS	47
4.2.1	Seleção de candidatos para avaliação imunoistoquímica	47
4.2.2	Avaliação da expressão das proteínas codificadas pelos 4 genes seleccionados por RT-qPCR em lesões CDIS puras e no componente in situ do CDIS-CDI do TMA 1	48
4.2.3	A proteína codificada pelo gene GRB10	49
4.2.4	Ensaio de Western Blot para análise da expressão da proteína GRB10	50

4.2.5	Associação entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e as variáveis clinicopatológicas no TMA CDIS (1)	50
4.2.6	Análise da expressão imunoistoquímica nuclear das proteínas GRB10, MAPK8, INPP1 e EDN1 no TMA CDIS (1).....	53
4.2.7	Demonstração fotográfica microscópica da localização e intensidade de expressão de GRB10 nos grupos de lesões que compõem o TMA 1 (CDIS puro e componente in situ do CDIS-CDI)	53
4.2.8	Avaliação de GRB10 como marcador candidato a predição de invasão em CDIS	57
4.2.9	Expressão proteica ao longo da progressão de carcinoma ductal de mama.....	58
4.2.10	Demonstração fotográfica microscópica da localização e intensidade de expressão de GRB10 nos TMAs 2 e 3 (compostos por CDI)	60
4.2.11	Avaliação do potencial prognóstico de GRB10	62
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÃO	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ANEXOS

- Anexo 1** Lista dos 57 genes diferencialmente expressos entre as amostras progressão ($p < 0,05$ e $\text{fold change} \geq |2|$), pertencentes às vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT
- Anexo 2** Caracterização das amostras do TMA CDIS (1)
- Anexo 3** Caracterização das amostras dos TMAs CDI (2 e 3)
- Anexo 4** Protocolo da Hibridação in situ Fluorescente
- Anexo 5** Caracterização da frequência de graus nucleares não alto grau (NAG) e alto grau (AG) das amostras CDIS do TMA (1)
- Anexo 6** Protocolo das reações imunoistoquímicas (IIQs)

- Anexo 7** Gráficos de expressão na análise de RT-qPCR pelo sistema TLDA dos 14 genes considerando as amostras de CDIS puro e componente in situ do CDIS-CDI
- Anexo 8** Gráficos de expressão na análise de RT-qPCR pelo sistema TLDA considerando amostras com mesmo grau nuclear (Grau 3)
- Anexo 9** Gráfico representativo da expressão do RNAm de GRB10 nos diferentes grupos de lesões (normal, CDIS puro, componente in situ do CDIS-CDI e CDI)
- Anexo 10** Gráficos de expressão dos genes validados por RT-qPCR (ensaio TLDA), ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama
- Anexo 11** Esquema demonstrativo da localização no cromossomo, dos 4 genes validados por RT-qPCR através do sistema TLDA
- Anexo 12** Gráficos de barras representando a frequência de expressão da proteína codificada pelos genes MAPK8, EDN1 e INPP1 nas amostras CDIS puro e componente in situ do CDIS-CDI analisadas por IIQ
- Anexo 13** A proteína codificada pelo gene GRB10
- Anexo 14** A expressão imunoistoquímica de GRB10 e o imunofenótipo molecular
- Anexo 15** Associação entre a expressão proteica de GRB10 e a sobrevida livre de doença e global com as características clinicopatológicas: (A) GRB10 e Grau de SBR; (B) GRB10 e comprometimento de linfonodos

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

O carcinoma mamário é a neoplasia maligna mais freqüente no sexo feminino e uma das neoplasias de maior incidência no mundo, com altas taxas de mortalidade. A incidência mundial apresenta-se em ritmo crescente, sendo que a maior parte dos casos ocorre em países desenvolvidos, tendo a Holanda, a incidência de 90,2/100.000; já nos Estados Unidos, a taxa é de 101,1/100.000 (CLEATOR e ASHWORTH 2004; JEMAL et al. 2011). No Brasil é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, com 52.680 novos casos previstos para 2012 (Ministério da Saúde 2012).

O risco de desenvolvimento da doença aumenta segundo a idade, que é considerado 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 com mulheres de 30-35 anos (VOGEL 2008). O histórico hormonal, com menarca precoce (antes dos 12 anos), 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 proliferativas intraductais, tais como hiperplasia ductal usual (HDU) e hiperplasia epitelial ductal atípica (HDA), apresentam risco de 1,5 a 2 vezes e de 3 a 5 vezes maior de desenvolvimento de carcinoma mamário invasivo, respectivamente (SCHNITT et al. 2012a). 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 controversa a influência do uso de contraceptivos orais por longo período de tempo no risco de surgimento da doença.

O risco de desenvolvimento de câncer de mama está 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).

O câncer de mama pode ser esporádico, representando cerca de 90% dos casos (TIEZZI 2009), ou hereditário, em torno de 5-10%. 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, podendo aumentar o risco para o aparecimento de câncer de mama (VOGEL 2008). Foram identificadas mutações em dois genes envolvidos com o mecanismo de reparo do DNA (*BRCA1* e *BRCA2*), 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.

As síndromes familiares de Li-Fraumeni (devido a mutações em *TP53*) e de Cowden (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.

A mamografia é o exame mais frequentemente utilizado para a detecção precoce de câncer de mama dentre os exames de imagem, sendo preconizado como de escolha para *screening* diagnóstico. Outros exames auxiliares podem ser realizados, como a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), ou por agulha grossa (*core biopsy*) (TSE e TAN 2010), guiados ou não, por mamografia ou ultrassom, em função do tamanho e localização da lesão.

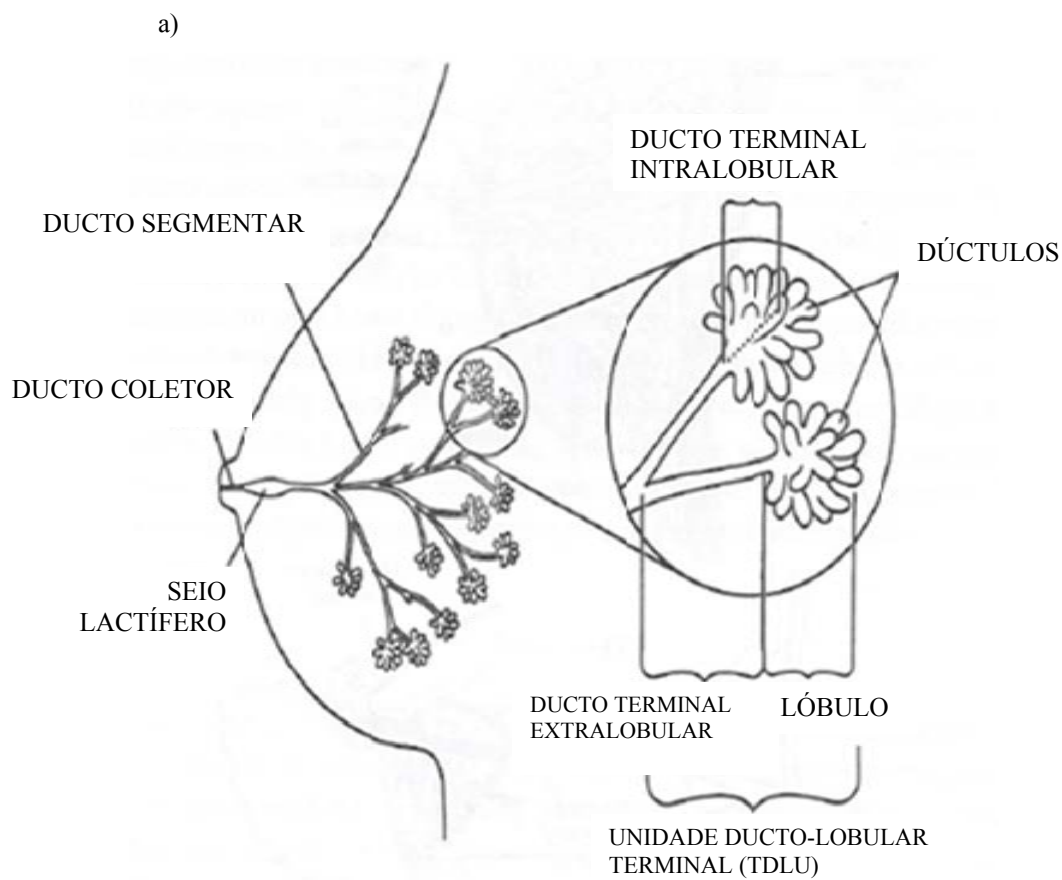
COSTANTINO et al. (1999) descreveram um modelo de risco absoluto (Índice de Gail) para auxiliar o clínico e o cirurgião na tomada de decisão, sobre

quais intervenções podem ser implementadas para reduzir a exposição do paciente a fatores de risco modificáveis, reduzindo assim, o risco absoluto de câncer de mama.

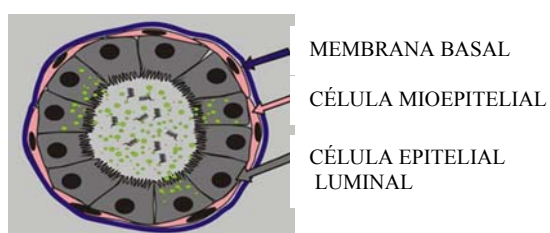
Além das características histopatológicas da lesão, a expressão de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e a superexpressão e/ou amplificação do oncogene *HER2* (item 1.5) representam importantes fatores prognósticos e preditivos de resposta à terapia em câncer de mama. O tratamento 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, em pacientes com positividade de expressão imunoistoquímica para este receptor) e/ou terapia imunológica. A cirurgia pode ser conservadora (resseção segmentar ou quadrantectomia), onde é retirada a área comprometida pela neoplasia com margens cirúrgicas de segurança, ou não conservadora (mastectomia total). O procedimento cirúrgico pode também incluir biópsia de linfonodo sentinela (LS), com ou sem esvaziamento dos 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. A opção pelo tratamento quimioterápico neoadjuvante é feita, quando há intenção de redução da massa tumoral, com possibilidade de cirurgia conservadora após o tratamento sistêmico do câncer de mama avançado (OSÓRIO et al. 2012).

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. Existem cerca de 15 a 20 ductos maiores, cuja abertura é na papila. Já o estroma é composto de quantidade variável de tecidos adiposo e conjuntivo, que compreende a maior parte do volume da mama no estado não lactante. Quanto ao aspecto histológico, o epitélio ductal normal da mama consiste de camada interna (luminal) de células epiteliais cuboides e camada externa de células mioepiteliais, apoiada na membrana basal (MB) do ducto (SCHNITT 1995) (Figura 1).

CORTE TRANSVERSAL DA MAMA FEMININA NORMAL



b)



Fonte: Baptist Medical Center South (2011).

Figura 1 - a) Estrutura morfológica da mama feminina normal. **b)** Representação esquemática do corte transversal de um ducto mamário normal.

1.2 A CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS

Na classificação dos carcinomas de mama, descrita pela *World Health Organization* (WHO), os tumores são divididos pelo tipo histológico (LAKHANI et al. 2012). A WHO descreve mais de 40 carcinomas mamários invasivos, entre tipos e seus subtipos.

O carcinoma ductal invasivo de tipo não especial (NST) é o tipo histológico mais frequente, compreendendo entre 40% e 75% dos casos publicados. Trata-se de neoplasia maligna composta por proliferação anormal de células, com capacidade de romperem a membrana basal dos ductos, invadirem os tecidos adjacentes, a circulação sanguínea e a linfática, podendo causar metástases.

A graduação histológica do CDI é baseada no método de SBR (Scarff-Blom e Richardson) modificado (ELSTON e ELLIS 1991), que é um método semi-quantitativo e baseia-se na somatória dos escores de três fatores histológicos: a formação de túbulos e glândulas [maioria do tumor (>75%); quantidade moderada (10-75%); pouca ou nenhuma (<10%)], o pleomorfismo nuclear (células pequenas, regulares e uniformes; variação moderada do tamanho do núcleo e marcada variação com a presença de nucléolos proeminentes) e a contagem mitótica em 10 campos de grande aumento (essa, dependente da área de campo microscópico). Um sistema de escore numérico de 1 a 3 é utilizado para cada fator independentemente. A somatória dos três valores atribuídos para cada fator varia de 3 a 9, correspondendo finalmente ao grau histológico, assim designado: 3-5 pontos (grau 1, bem diferenciado); 6-7 pontos (grau 2, moderadamente diferenciado) e 8-9 pontos (grau 3, pouco diferenciado) (COLDITZ e CHIA 2012).

1.3 O ESTADIAMENTO DO CARCINOMA MAMÁRIO INVASIVO

O estadiamento dos tumores mamários segue o sistema de classificação de tumores malignos (sistema TNM), publicado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e pela *Union for International Cancer Control* (UICC), estando vigente a sua 7ª edição. O estadiamento clínico é baseado no sistema TNM de acordo com exames físicos e o diagnóstico por imagem. A letra “T” (tumor ou 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 2cm, entre 2 e 5cm, maior que 5cm, ou tumor de qualquer tamanho que apresente extensão direta à parede torácica ou à pele, respectivamente. A letra “N” (linfonodos ou N) refere-se à metástase em linfonodos regionais, sendo o tumor classificado como: N0 na ausência de metástases linfonodais regionais; como N1, na presença de células tumorais em linfonodos axilares ipsilaterais móveis, níveis I e II axilares; como N2, na presença de células tumorais em linfonodos axilares ipsilaterais fixos, ou cadeia mamária interna ipsilateral, na ausência de evidência clínica de metástase axilar; como N3, na presença de células tumorais em linfonodos infraclaviculares (nível axilar III), linfonodos ipsilaterais da cadeia mamária interna (detectado por exame clínico ou por estudos de imagem), com evidência clínica de metástase axilar em níveis I e II, ou com metástase ipsilateral em linfonodo supraclavicular, com ou sem envolvimento de mamária interna. A letra “M” (metástases ou 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.

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. A categoria p(N) corresponde ao N e requer a ressecção de LS na maioria dos casos. Ainda que o LS seja positivo, o cirurgião pode optar por não fazer a linfadenectomia, conforme os dados do AcoSOG z0011. O pN0 significa 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, ou com linfonodo infraclavicular comprometido. A categoria p(M) corresponde ao M.

Os estadios são numerados de 0 a IV, em ordem decrescente de sobrevida. 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 (LAKHANI et al. 2012). Os grupamentos por estadio são descritos no Quadro 1.

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

Estádios	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T0,T1	N1mi	M0
Estádio IIA	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0,T1,T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Estádio IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Abreviações: Tis, Tumor *in situ*. T1mic 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: LAKHANI et al. (2012).

1.4 O CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DA MAMA

O CDIS consiste em uma proliferação celular epitelial precursora, confinada ao sistema ducto-lobular mamário, caracterizada por atipia citológica, que pode variar de sutil a marcada e por apresentar uma tendência inerente, porém não obrigatória, para a aquisição de capacidade de invasão através da membrana basal. Sua incidência é crescente, principalmente devido aos métodos de detecção precoce para lesões mamárias não palpáveis e ao conhecimento de sua freqüente associação com padrões típicos de microcalcificações (LEONARD e SWAIN 2004).

Esse tipo tumoral inclui um grupo heterogêneo de lesões com apresentação clínica, fatores histológicos e potenciais biológicos diversos, confinado à ramificação ductal mamária em qualquer nível. O seu potencial maligno é distinto, podendo progredir rapidamente para o carcinoma invasivo, ou não apresentar evolução durante um longo período da doença.

A graduação histológica do CDIS da mama tem sido objeto de estudo para determinar o seu valor preditivo de risco para recorrência, após terapia conservadora.

Um consenso internacional realizado em 1997 recomendou uma graduação baseada em fatores citonucleares (SCHNITT et al. 2012b). Estudos recentes têm proposto novos sistemas de graduação para o CDIS. Alguns autores propuseram um escore histológico de graduação para o CDIS, aos moldes do método de SBR (Scarff-Blom e Richardson) modificado (ELSTON e ELLIS 1991), utilizado para o carcinoma invasivo (ALLRED et al. 2008). Fatores anatomopatológicos, tais como o alto grau citonuclear, a dimensão da neoplasia, o padrão de crescimento, a presença de necrose ou inflamação crônica e a excisão incompleta ou incerta, com margens cirúrgicas exíguas, estão associados com recorrência ipsilateral. Um subgrupo de neoplasias composto por CDIS de “altíssimo” grau, constituído por alto grau citonuclear, arquitetura sólida (>50% da neoplasia), extensa necrose do tipo comedo (> 50% dos ductos), indicam um pior prognóstico, com recorrência ipsilateral da doença *in situ* ou invasiva, quando comparado com baixo, intermediário e alto graus clássicos, baseados apenas no grau citonuclear (PINDER et al. 2010). Ainda hoje, não há um consenso universal para o melhor sistema de classificação do CDIS. Deve ser mencionada a classificação arquitetural com os tipos comedo, sólido, cribriforme, micropapilar e papilífero. Sistemas modernos combinam o uso do grau nuclear isoladamente, ou em combinação com necrose e/ou polarização celular. A recomendação da Conferência Internacional de Consenso realizada em 1997, que considera a graduação do CDIS baseada primariamente em fatores nucleares, está mantida na atual edição do livro da WHO (SCHNITT et al. 2012b), até que novos dados clínico-patológicos sejam publicados. O CDIS é dividido em três graus: baixo, intermediário e alto. Não é raro o encontro de heterogeneidade de graus em uma mesma biópsia, ou até no mesmo espaço ductal, embora geralmente, células com baixo e alto graus não sejam observadas juntas num mesmo grupamento celular. Recomenda-se que o patologista mencione o tipo de necrose (comedo ou punctata), o padrão arquitetural, a polarização celular, a extensão (por estimativa) da neoplasia, presença de microcalcificações e o *status* da margem cirúrgica em seus laudos.

O Quadro 2 demonstra as características morfológicas mais relevantes em cada grau histológico do CDIS.

Quadro 2 - Características morfológicas do CDIS de acordo com o grau histológico

GRAUS	ARQUITETURA	NÚCLEO	NECROSE	POLARIZAÇÃO
Baixo	arcadas, micropapilas, cribriforme, sólido	pequeno, monomórfico cromatina regular; nucléolo incóspuo; mitose rara	presente ou não (punctata ou comedo)	Presente
Intermediário	arcadas, micropapilas, cribriforme, sólido	leve a moderada variação do tamanho; cromatina variável, grosseira; nucléolo mais proeminente; mitose pode estar presente		Diminuída
Alto	sólido, cribriforme, micropapilar, “ <i>Clinging</i> ” (camada única), microcalcificações	pleomórfico; cromatina densa; nucléolo proeminente; mitose comum, não obrigatória	comedo frequente, não obrigatória	Escassa

Fonte: SCHNITT et al. (2012b).

1.5 A CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MAMÁRIOS BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES

A procura por respostas sobre o prognóstico e a predição de resposta ao tratamento (MOLINA et al. 2005) têm incrementado a investigação de marcadores moleculares.

1.5.1 A classificação de tumores mamários baseada em expressão proteica de RE e RP

A detecção da expressão proteica dos receptores hormonais de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) é um importante marcador prognóstico e de predição ao tratamento, utilizado na rotina clínica do carcinoma ductal de mama (HARRIS et al. 2007; HAMMOND et al. 2010). A expressão imunoistoquímica positiva dos receptores hormonais no carcinoma ductal de mama é um marcador molecular estabelecido como indicativo de bom prognóstico.

Os hormônios estrógeno e progesterona agem juntos na diferenciação e no crescimento do epitélio mamário através de seus receptores nucleares, que modulam a transcrição de diversos genes alvo (JENSEN e JORDAN 2003). O receptor de estrógeno promove a ativação de vários genes, entre eles o gene codificador de RP. Dessa forma, a detecção dos dois receptores hormonais sinaliza que o receptor de estrógeno está funcionando (EISENBERG e KOIFMAN 2001).

Maiores investigações sobre as características moleculares de lesões precursoras de câncer de mama têm delineado novas vias nas etapas da progressão, através de correlações genótípicas-fenotípicas. Há evidências de que, lesões que apresentam RE positivo, sejam doenças distintas daquelas com RE negativo. Um estudo associou o grau histológico à expressão proteica do RE. No grupo RE positivo, o grau histológico associou-se fortemente ao número e complexidade de alterações genéticas no câncer de mama (LOPEZ-GARCIA et al. 2010).

Pesquisadores descobriram recentemente, que tratamentos com estrógeno em linhagens celulares, alteraram 25% dos transcritos produzidos na célula do câncer de mama, mostrando um efeito profundo na modulação da expressão gênica. Adicionalmente, o estudo mostrou que o estrógeno estimula não somente genes codificadores de proteína, mas também interfere na transcrição de RNAs não codificantes. Trata-se do estrógeno coordenando as respostas das transcrições através do genoma (HAH et al. 2011).

Os anti-estrogênicos, 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 RE, o RE 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 no tecido mamário. Os tumores RE e RP positivos têm grande benefício com a terapia hormonal, sendo que aqueles que apresentam apenas expressão positiva de RE ou RP, respondem significativamente ao tratamento hormonal (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 *status* ER positivo, o uso de tamoxifeno pode ser efetivo em aproximadamente 50% dos casos (OSBORNE 1998).

1.5.2 A expressão proteica de RE e RP em CDI

Os tumores invasivos que apresentam expressão de receptores hormonais apresentam, em geral, menor índice proliferativo, são mais diferenciados e igualmente elegíveis a terapias endócrinas (LEONARD e SWAIN 2004). Outros

tipos de terapia endócrina, como o uso de inibidores de aromatase, que também suprimem a produção de estrógeno, são dependentes igualmente do *status* do RE. Assim como para o CDIS, define-se como RE clinicamente positivo, 1% ou mais de células neoplásicas com marcação nuclear. O RP é expresso em torno de 60-70% das células neoplásicas invasivas.

1.5.3 A expressão proteica de RE e RP em CDIS

Na prática corrente, o RE é o único biomarcador validado em CDIS. Porém a sua validação clínica no CDIS é menos compreendida do que no CDI, provavelmente em virtude de existirem poucos estudos clínicos randomizados de terapia hormonal adjuvante em CDIS. Uma recente publicação que utilizou material proveniente de banco de tumor, demonstrou que após tamoxifeno adjuvante as pacientes tiveram uma redução significativa de risco de recorrência ipsilateral de CDIS e/ou progressão para carcinoma invasivo, em cerca de 50%, em pacientes tratadas com cirurgia conservadora e radiação e que o benefício é restrito às pacientes com doença RE positivo (ALLRED et al. 2012). Portanto, o tratamento endócrino é indicado para as lesões CDIS positivas para os receptores hormonais. Os resultados para o RP são similares, porém menos significativos. Em torno de 75-80% dos casos de CDIS são receptores de estrógeno positivos, com marcação nuclear. A frequência de expressão de RP é geralmente pouco menor do que a de RE. Na prática, o resultado da expressão de RP é também definido como positivo, se presente em 1% ou mais de células neoplásicas com marcação nuclear.

1.5.4 A classificação de tumores mamários baseada em HER2

O gene *HER2* é um dos quatro membros da família de receptores de fator de crescimento epitelial: *EGFR (HER1/ERBB1)*; *ERBB2 (HER2 ou HER2/ neu ou c-erbB2/neu)*; *ERBB3 (HER3)*; e *ERBB4 (HER4)*. As proteínas dessa família são transmembrânicas com domínio citoplasmático tirosina-quinase e estão envolvidas com o desencadeamento de sinais proliferativos e antiapoptóticos e com a ativação de vias como MAPK, PI3K/Akt e mTOR. Assim, elas podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral, sendo o gene *HER2* o

membro da família com maior importância para o câncer de mama (HYNES e MCDONALD 2009).

Na rotina clínica, a expressão da proteína HER2 é determinada por imunohistoquímica (IIQ), com um escore que varia de 0 a 3+, sendo 0 e 1+ considerados negativos, 2+ indeterminado e 3+ positivo (WOLFF et al. 2007).

1.5.5 O *status* HER2 em CDI

Em torno de 25 a 30% dos carcinomas mamários invasivos apresentam super-expressão da proteína HER2, especialmente devido à amplificação do gene *HER2*, o que confere um prognóstico mais agressivo (SLAMON et al. 1989; PICCART-GEBHART 2006; TANEJA et al. 2010), com menores taxas de sobrevida (PEGRAM et al. 1998; CURTIS et al. 2012). Para o carcinoma mamário invasivo, os casos com marcação indeterminada (2+) pela IIQ, devem ser avaliados pela técnica de FISH (do inglês, *Fluorescence In Situ Hybridization*) para verificação da presença de amplificação genômica de *HER2*. Nesta situação, o FISH é o exame de escolha para a determinação do tratamento.

A presença de HER2 por IIQ (3+) ou FISH (amplificado) indica predição de resposta a trastuzumab, também conhecido como Herceptin®, um anticorpo monoclonal que reconhece o domínio extracelular do receptor, impedindo sua dimerização e inibindo sua atividade de quinase (HYNES e LANE 2005), ou ao Lapatinib, uma pequena molécula, inibidora de domínios tirosina-quinase (SPECTOR et al. 2005).

As recomendações da ASCO/CAP 2007 (WOLFF et al. 2007) sobre os critérios estabelecidos para obtenção do *status* ou teste HER2 podem ser visualizadas no *guideline* abaixo:

- **Teste HER2 positivo:** IIQ 3+ (definida como coloração intensa de membrana em mais de 30% de células tumorais invasivas), ou FISH amplificado (razão entre *HER2* e CEP17 > 2.2 ou número de cópias do gene *HER2* > do que 6 sinais/núcleo para o teste sem controle interno);
- **Teste HER2 indeterminado:** definido como IIQ 2+, ou FISH com razão 1.8-2.2, ou número de cópias do gene *HER2* com 4 a 6 sinais/núcleo para o teste sem controle interno;

- **Teste HER2 negativo:** definido como IIQ 0-1+, ou FISH com razão < 1.8 , ou número de cópias de gene *HER2* < 4 sinais/núcleo para o teste sem controle interno.

1.5.6 HER2 e o CDIS

Estudos sobre *HER2* e CDIS sugerem que em 50% dos casos, a super-expressão deste gene está associada a lesões menos diferenciadas, histologia do tipo comedo e de alto grau (MILLIS et al. 1996; VOS et al. 1999). Cerca de 60% dos casos CDIS apresentam maior expressão da proteína HER2 (BACUS et al. 2000), que é mais frequentemente encontrada em CDIS do que em CDI, sugerindo um possível papel na tumorigênese (DIGIOVANNA et al. 2002). No entanto, a presença de HER2 não está associada a tratamento com droga-alvo em CDIS.

1.5.7 Outros marcadores moleculares em CDI

No CDI, além dos três marcadores clássicos, acima descritos, há outros importantes para a rotina clínica como Ki67, um marcador de proliferação celular, utilizado como fator prognóstico. Há ainda, p53, p14ARF, ciclina D1, ciclina E, TBX 2/3, BRCA1/2 (item 1.1) e VEGF, que estão envolvidos com processos como a regulação das vias dos genes supressores de tumor *TP53* e *RB*, resposta ao dano de DNA, resposta à angiogênese e metástase (TANEJA et al. 2010).

PEROU et al. (2000), através da tecnologia de cDNA *microarray*, sugeriram uma classificação molecular para os tumores mamários invasivos. A classificação molecular baseia-se em 5 grupos: luminal A, luminal B, super-expressor do *HER2*, normal-*like* e basal ou basalóide. Estudos imunistoquímicos subsequentes em grande escala demonstraram o valor da expressão dos biomarcadores moleculares em combinação, mais do que individualmente (RAKHA et al. 2010). O subtipo luminal A apresenta expressão positiva dos receptores hormonais (RHs), HER2 negativo, alta expressão de citoqueratinas (CKs) 8 e 18 e é geralmente associado a um bom prognóstico e à boa resposta ao tratamento com antiestrogênicos. O subtipo luminal B apresenta expressão positiva dos RHs, HER2 positivo e/ou Ki67 elevado e expressão de CKs 8 e 18, geralmente associado a um prognóstico menos favorável. O subtipo superexpressor de HER2 (expressão negativa dos REs e HER2 positivo)

apresenta boa resposta a drogas que bloqueiam a atividade do *HER2*, como o anticorpo monoclonal trastuzumab. Apesar de ainda permanecer muito controversa a sua definição, o subtipo *normal-like* tem sido considerado inclassificável, por não expressar os cinco principais anticorpos (RE, RP, HER2, CK5/6 e HER-1) pelo método imunistoquímico (YU et al. 2009). O subtipo basal ou “basalóide” apresenta expressão das CK5/6, CK14 e CK17. Entretanto, nem todos os tumores basalóides determinados pelo perfil de expressão gênica, perdem RE, RP e HER2 e, ao contrário, nem todos os tumores TN [isto é, com expressão negativa dos receptores hormonais de progesterona (RP) e de estrogênio (RE), além de HER2 negativo] mostram fenótipo basal por análises de expressão de *array*. Deve ser lembrado que, a maioria dos carcinomas mamários “basalóides” apresenta um fenótipo triplo negativo (TN) e que, a grande maioria dos carcinomas TN apresenta transcriptoma *basal-like*. Assim, há um significativo número de carcinomas TN que não expressam marcadores basais e um pequeno, mas significativo subgrupo de carcinomas “basalóides”, que também expressam receptores hormonais ou HER2 (BADVE et al. 2011).

Há evidências de associação entre o carcinoma mamário “basalóide” e a presença de mutações genéticas em *BRCA1* e *2*. Um estudo com mulheres jovens brasileiras demonstrou que o subtipo TN está associado somente com *BRCA1*, sendo que quase 50% de mulheres jovens diagnosticadas com tumores TN apresentaram mutação germinativa neste gene (CARRARO et al. 2013).

Além disso, há um significativo número de tumores TN, que não expressa marcadores basais e são também classificados como *normal-like* (provável artefato do método de expressão gênica, devido amostras com desproporcionalidade entre um alto conteúdo de estroma e células epiteliais mamárias normais) (HU et al. 2006), perfil molecular apócrino (embora uma grande proporção seja de subtipo HER2), ou *low-claudina* (com fatores sugestivos de transição epitélio-mesênquima, enriquecidos por *stem-cells* tumorais) (PRAT et al. 2010; BADVE et al. 2011).

Os tumores TN, especialmente os de subtipo basal, são dos mais intrigantes subtipos tumorais, por apresentarem pior prognóstico e não possuírem alvo terapêutico definido, como os outros subtipos. Portanto, não responde ao tratamento com drogas antiestrogênicas, nem ao anticorpo monoclonal anti-HER2 (SORLIE et

al. 2001; CIANFROCCA e GRADISHAR 2009). Este subtipo tem sido extensamente revisado, permanecendo ainda, sem definição de consenso internacional.

1.5.8 Outros marcadores moleculares em CDIS

Quase todos os marcadores relatados serem expressos em CDI, também o são em CDIS, embora a prevalência seja diferente entre os dois grupos de tumores. Os maiores subtipos moleculares encontrados em CDI (luminal A, luminal B, HER2 e basal) são observados no CDIS, com frequências diferentes (ALLRED et al. 2008).

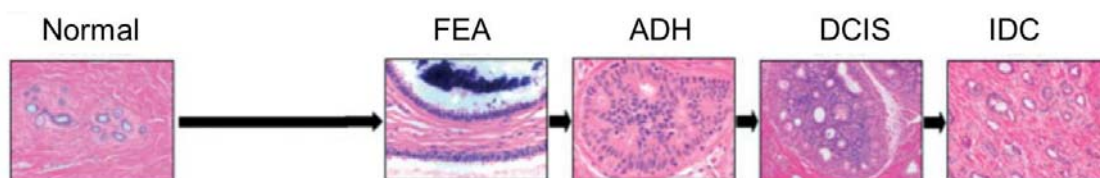
1.6 A PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL DA MAMA

Atualmente, um dos maiores desafios na pesquisa molecular da neoplasia mamária, é identificar genes que possam prever o risco de progressão para doença invasiva e também, que sirvam como marcadores de prognóstico (CASTRO 2008).

A biologia da progressão do câncer de mama ainda é pouco compreendida. 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 de maior elucidação (MA et al. 2003). A análise morfológica do tecido mamário humano pode revelar a presença de lesões que representam progressão de um processo constituído por múltiplos passos para a malignidade. Este processo de tumorigênese reflete as alterações genéticas capazes de direcionar as células normais para transformação em células malignas, com caráter agressivo, caracterizado por crescimento auto-suficiente, ausência de resposta a apoptose, potencial replicativo ilimitado, manutenção da angiogênese, capacidade de invasão e metástase. As alterações genéticas provocam modificações mecânicas, com aparente cronologia, diferentes níveis de mutação e a possibilidade de ocorrência de todos os passos da carcinogênese no tecido mamário, capazes de causar os tipos tumorais diferenciados (HANAHAN e WEINBERG 2000).

O modelo clássico de progressão do carcinoma ductal da mama sugere uma progressão contínua, mas não obrigatória, através de uma série de etapas. O processo inicia-se em um tecido normal, progredindo para atipia epitelial plana (AEP),

seguido por hiperplasia ductal atípica (HDA), avançando para o CDIS e culminando em CDI, que pode resultar em doença metastática (Figura 2) (Wellings e Jensen 1973, citado por BOMBONATI e SGROI 2011, p.2).



Fonte: BOMBONATI e SGROI (2011).

Abreviações: FEA, do inglês, *Flat epithelial atypia*; ADH, do inglês, *Atypical ductal hyperplasia*; DCIS, do inglês, *Ductal carcinoma in situ*; IDC, do inglês, *Invasive ductal carcinoma*.

Figura 2 - Modelo clássico de progressão do carcinoma ductal de mama.

Outros sugerem que vários tipos de câncer de mama parecem desenvolver-se, não obrigatoriamente, a partir de uma série de estágios histológicos pré-malignos. Nesse caso, sugere-se que o CDIS é composto de células tumorais confinadas ao sistema ductal mamário, que não possuem características moleculares que lhe confirmam a habilidade de degradar a membrana basal (SETH et al. 2003) e ainda, que a recorrência após a retirada do tumor, deva-se a um provável carcinoma invasivo presente na mama, não detectado previamente pelo patologista (NAKHLIS e MORROW 2003). De acordo com a segunda hipótese, o CDIS seria um tipo de tumor distinto, que pode ou não, possuir informação molecular para invasão, não sendo necessariamente um precursor do estágio de CDI.

Na literatura há um maior consenso de que o carcinoma o CDIS seja um precursor do CDI, 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 CDIS, quanto à sua capacidade de invasão de tecidos adjacentes e conseqüentemente de progressão para a doença invasiva (WARNBERG et al. 2001). Além disso, alguns estudos sugeriram que, ao contrário da hipótese da progressão linear clássica, a heterogeneidade intra e intertumoral pode ser determinada pela diversidade clonal, sendo um evento incorporado à célula, conduzindo a invasão (POLYAK 2008).

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

Muitos grupos têm apresentado evidências de que as características moleculares, avaliadas por expressão gênica global, são semelhantes entre células do componente *in situ* e invasivo, sugerindo que a aquisição da capacidade de invasão já está presente nas células epiteliais dentro dos ductos (MA et al. 2003; SCHUETZ et al. 2006; CASTRO et al. 2008). Neste sentido, estudando grupos de células capturadas de lesões representativas de progressão de CD de mama, nosso grupo demonstrou que as maiores alterações moleculares ocorrem entre células de lesões pré-invasivas de diferentes potenciais malignos, células do CDIS e do componente *in situ* do CDIS-CDI, sendo que as células do componente *in situ* do CDIS-CDI apresentam grande semelhança com as células do CDI (CASTRO et al. 2008). Estes resultados contrariam os aspectos morfológicos e reforçam que as alterações moleculares que levam à perda de adesão célula-célula e à aquisição da capacidade de invadir os tecidos adjacentes já estão presentes nas células antes da manifestação morfológica da invasão (Figura 3).

matriz extracelular, que visam estudar a resposta fibroblástica do estroma à neoplasia (CHANG et al. 2004), genes relacionados ao p53 (JORDAN et al. 2010) e genes de invasão (LIU et al. 2007).

Durante a progressão tumoral, as células epiteliais do tumor primário podem perder a capacidade de adesão e iniciar o processo de invasão da MB da estrutura de origem, caindo na circulação sanguínea ou linfática e formando áreas de proliferação em outros tecidos ou órgãos, em um processo conhecido como metástase (FIDLER 2003). A metástase é a principal causa de morte por câncer de mama. Em mama, uma vez que as células tumorais adquirem a capacidade de degradar a membrana basal que delimita a estrutura ductal, o tumor que invade ganha um potencial de disseminação para órgãos distantes, sendo o fígado, o pulmão e o tecido ósseo, os sítios mais frequentes. O processo metastático é dividido em quatro etapas: invasão, onde as células neoplásicas perdem a adesão célula-célula, ganhando motilidade, o que permite que elas invadam tecidos adjacentes; intravasão, que ocorre quando células tumorais entram na circulação sistêmica através do endotélio sanguíneo, ou dos vasos linfáticos; extravasão, onde as células sobreviventes ao processo de intravasão, extravazam através do endotélio capilar e finalmente, na última etapa, o grupo de células tumorais sobreviventes coloniza um novo tecido, obtendo sucesso na proliferação e crescimento, podendo dar origem a uma micrometástase e resultar em tumores malignos secundários.

A heterogeneidade intertumoral do CDIS em nível molecular tem sido relatada na literatura, porém não se conhece uma assinatura genética preditiva de progressão (POLYAK 2010).

Em estudos anteriores do grupo, células das lesões *in situ* e invasivas associadas na mesma amostra (CDIS-CDI) foram investigadas em duas plataformas distintas de cDNA *microarray*: uma delas, denominada universal (BRENTANI et al. 2005) sem a representação de via metabólica específica ou funcional; outra (2.3K), com os genes das vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT (Transição epitélio-mesênquima) (CASTRO 2008).

A partir da plataforma universal que contém 4.608 clones de ORESTES correspondentes a genes humanos, foi comparado o padrão de expressão de células dos quatro grupos que mimetizam a progressão do CD da mama. Para identificar

genes com potencial de predizer o risco de invasão do CDIS, foi comparado o padrão de expressão de células capturadas de duas lesões morfológicamente idênticas (CDIS puro e componente CDIS associado ao CDI), identificando-se 147 genes. A clusterização hierárquica, baseada no padrão de expressão desses genes, foi capaz de separar as amostras em dois grupos distintos, sendo que 100% das amostras normais e 60% das amostras CDIS puro, permaneceram no mesmo grupo, separadas em 100% das amostras representativas de células do componente *in situ* de CDIS-CDI (CASTRO 2008). Estes genes foram sugeridos como estando envolvidos nos estágios iniciais do processo de malignização do CDIS (CASTRO et al. 2008).

Em outro estudo mais recente do grupo, ABUÁZAR (2012) avaliou 61 genes em detalhes (*ADFP, ALMS1, ANAPC13, ARHGAP19, ARHGAP9, AZGP1, C16orf5, C3AR1, CAMP, CHRNBI, CHST10, CLTCL1, CORO1C, CPNE3, CTTNBP2NL, DENND3, DGCR2, DHX35, EPOR, ERC1, FCN1, FGFBP1, FN3K, GBGT1, GOSR2, HLTF, IFT57, IMMT, IRF8, ITGB2, KIAA0664, LOX, LPXN, LSM4, MBD3, NEDD9, NGDN, NMU, OSBPL7, P4HB, PCDH10, PEPD, PIAS2, PMPCA, PPTC7, PTBP2, RABEPK, RAD51AP1, RARRES3, REC8, SAMD4A, SLC6A20, SOX13, STX11, SULF1, SYN1, TARDBP, TRAP1, TXNDC11, UTP20, ZBTB5*) por RT-qPCR. Este trabalho confirmou a expressão diferenciada entre células capturadas de lesões pré-invasivas (CDIS puro e componente *in situ* de CDIS-CDI) em 51,6% dos genes estudados, sendo que *ADFP, ANAPC13, ARHGAP19* e *CLTCL1* apresentaram maior expressão no CDIS puro e *LOX* e *SULF1* apresentaram maior expressão no componente *in situ* do CDIS-CDI. É importante destacar que na etapa de confirmação por RT-qPCR foram usadas novas amostras, com o intuito de identificar os genes mais robustos envolvidos nos primeiros estágios da progressão do CDIS (ABUÁZAR 2012). Dois desses genes foram investigados com mais detalhes: *ANAPC13* e *CLTCL1*, confirmando a maior expressão no CDIS puro. A análise pelo método imunistoquímico da expressão das proteínas ANAPC13 ($P=0.04$) e CLTCL1 ($P=0.04$), em amostras parafinadas dos dois tipos de lesões (CDIS puro e componente *in situ* de CDIS-CDI) confirmaram os resultados da expressão transcricional, mostrando maior frequência de positividade proteica nas lesões CDIS puro, sugerindo serem potenciais candidatos à predição de progressão do CDIS da mama. Em adição, a expressão imunistoquímica positiva de ANAPC13 foi

diretamente associada com a ausência de recorrência ($P=0.01$), com longo período de sobrevida geral (teste de Log-rank: $p=0.0025$), com sobrevida livre de doença (teste de Log-rank: $p=0.026$) e inversamente associada com o número de linfonodos comprometidos, apresentando significância marginal ($P=0.09$) (SENS-ABUÁZAR et al. 2012). Esses resultados elucidam que a investigação de diferença de expressão entre células de lesões pré-invasivas, com diferentes potenciais malignos, pode levar a identificação de genes importantes na progressão do carcinoma ductal de mama.

1.7 AS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT, PI3K E PROCESSO EMT (lâmina de vias 2.3K)

Algumas das vias de sinalização celular estão envolvidas com o processo de invasão e metástase. Uma delas é a via WNT, onde a proteína β -catenina apresenta importante função. O controle entre ativação e inativação desta via é importante durante o desenvolvimento embrionário e também para a manutenção do tecido adulto. Nas células adultas, a β -catenina está localizada na membrana celular e participa da formação de complexos protéicos responsáveis pela adesão celular. A degradação da β -catenina ocorre nos proteossomos, após a fosforilação e a ubiquitinação. A fosforilação de β -catenina ocorre nos resíduos de serina e treonina, na porção amino-terminal dessa proteína e é realizada pelo complexo formado por *APC* e *GSK3 β* (PEIFER e POLAKIS 2000). Porém, quando a fosforilação não ocorre, a β -catenina não degrada, acumula-se no citoplasma e é transportada para o núcleo (ABERLE et al. 1997), onde forma um complexo com a família de ligantes de DNA, TCF/LEF, sendo responsável pela regulação da transcrição de genes, tais como o *c-MYC* (HE TC 1998) e a *ciclina D1* (TETSU e MCCORMICK 1999), além de ativar outros genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima (EMT-*epithelial-mesenchymal transition*), levando à diminuição de E-caderina na membrana.

A ativação ou a inibição da via de sinalização WNT é mediada pelas proteínas WNTs. Estas proteínas são reguladores importantes da proliferação e da diferenciação celular e sua sinalização envolve outras proteínas que participam diretamente da transcrição e da adesão celular (NELSON e NUSSE 2004). No

genoma dos mamíferos existem 19 genes *WNTs*. No processo de ativação, as proteínas *WNTs* ligam-se aos receptores de superfície celular da família Frizzled, formando o complexo WNT/FRIZZLED. Tal formação antagoniza o complexo APC-axina, o que leva a um bloqueio da fosforilação de β -catenina, com o auxílio das proteínas Dishevelled (PEIFER e POLAKIS 2000). Os múltiplos passos que ligam a adesão celular à sinalização da via WNT indicam que estes dois processos estejam co-evoluindo (NELSON e NUSSE 2004).

Alterações nas propriedades de adesão das células tumorais estão associadas com progressão tumoral e formação de metástases. O processo chamado de transição epitélio-mesênquima EMT, (*epithelial mesenchymal transition*) envolve a perda da adesão celular mediada por *E-caderina* (do inglês, *epithelial cadherin*), a alteração na morfogênese e na arquitetura do tecido epitelial, a perda da polaridade celular e a inibição por contato, o crescimento desregulado e a invasão de tecidos adjacentes. O processo EMT é essencial no período embrionário durante os movimentos de gastrulação e na formação da crista neural, porém vem sendo também investigado nas primeiras etapas da invasão e metástase de vários tipos tumorais, incluindo o de mama (ACKLAND et al. 2003; VINCENT-SALOMON e THIERY 2003).

Assim, o surgimento do processo EMT é marcado pela diminuição da função da *E-caderina*. As células epiteliais passam a apresentar um fenótipo *fibroblasto-like*, com atividade invasiva (BOYER et al. 2000), o que tem sido recentemente associado às mudanças moleculares observadas nas células neoplásicas metastáticas mais agressivas (THIERY 2003). Recentemente, um aumento da expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima (*TGF β 1* e *c-met*) foi significativamente associada à progressão de CDIS para CDI (LOGULLO et al. 2010).

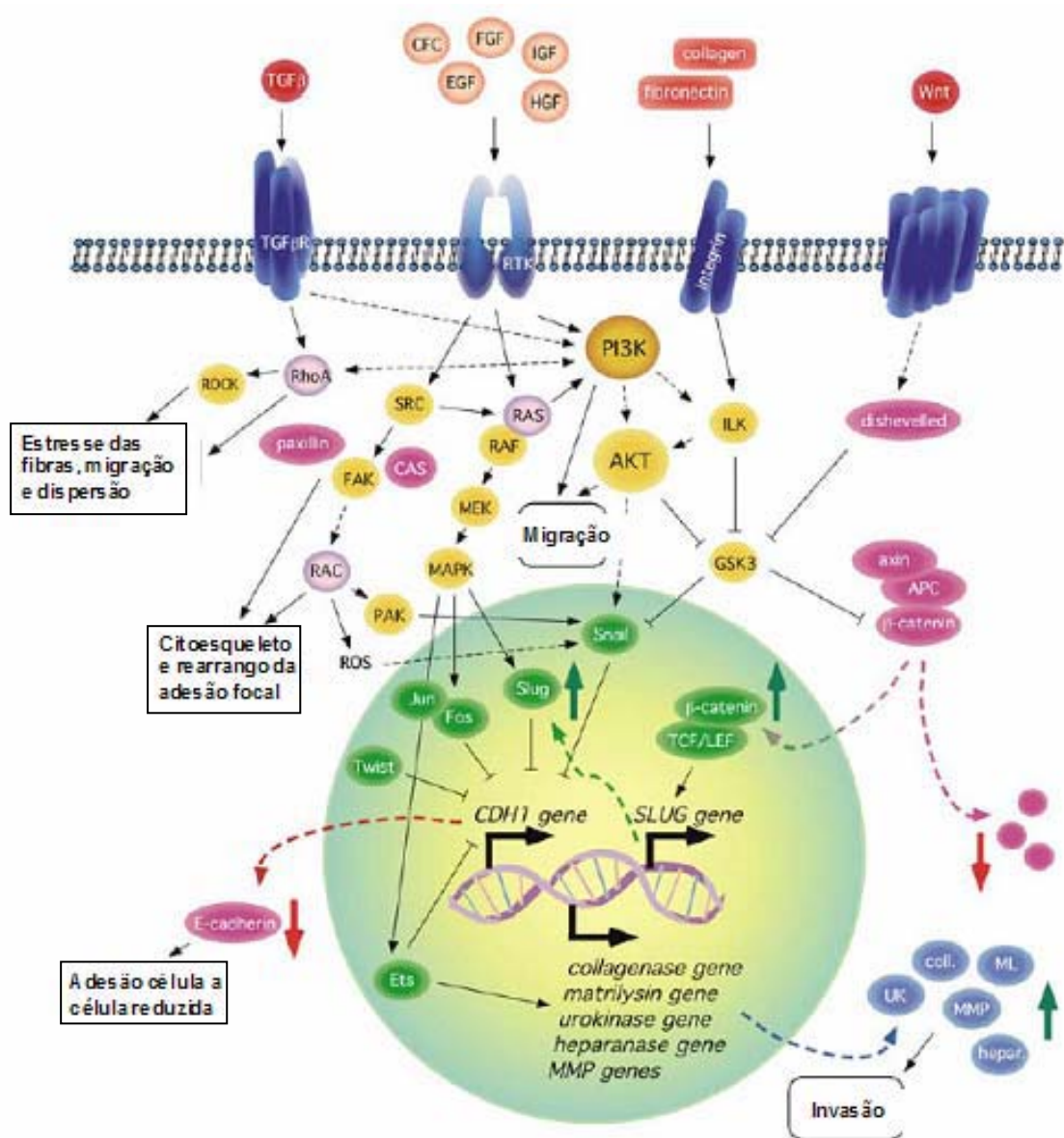
Outra via relacionada com o processo de invasão e metástase é a via de sinalização PI3K. As proteínas PI3Ks são heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade regulatória p85. Como efetores de sinalização, a via PI3K possui os membros da família *AKT serina-tirosina quinase*, os quais estão envolvidos na repressão da expressão do gene *E-caderina*, induzindo a processos invasivos e metastáticos (GRILLE et al. 2003). Células que produzem constitutivamente formas ativas de AKT produzem também o repressor transcricional, SNAIL, conhecido por reprimir a expressão do gene *E-caderina*

(GRILLE et al. 2003). O estudo que demonstrou esta repressão transcricional, utilizou linhagem de carcinoma de células escamosas que super-expressavam *AKT* mutado e induziram respostas celulares levando a conversão de células epiteliais em células invasivas mesenquimais (GRILLE et al. 2003). A indução do processo de EMT através da *AKT* ativada envolve a perda de adesão célula a célula, mudanças na morfologia, perda da polarização celular, indução da motilidade celular, diminuição da adesão célula-matrix e mudanças na produção e distribuição de proteínas específicas (LARUE e BELLACOSA 2005).

A via PI3K/AKT apresenta-se frequentemente ativada no câncer epitelial humano (RINGEL et al. 2001; SUN et al. 2001; TESTA e BELLACOSA 2001). Além de estar envolvida na regulação da E-caderina, também se relaciona com a produção de metaloproteinases (KIM et al. 2001; PARK et al. 2001), motilidade e invasão (ALTOMARE e TESTA 2005; MAJUMDER e SELLERS 2005). Essa via apresenta-se envolvida na apoptose, na via de sinalização ErbB, Jak-STAT, mTOR e VEGF, na adesão focal, na regulação de citoesqueleto de actina e na transdução de sinais.

Enquanto a via canônica de sinalização WNT e PI3K/AKT pode convergir no ponto de inibição da *GSK3 β* , há indicações de que as duas vias possam afetar e fosforilar diferentes tipos de *GSK3* (WESTON e DAVIS 2001; GRILLE et al. 2003). Outra possível conexão inclui a estimulação da atividade AKT, através da sinalização Wnt/Dishevelled (FUKUMOTO et al. 2001) e a estimulação inversa da transcrição da *β -catenina* (e possivelmente fosforilação) pela AKT (TIAN et al. 2004). Porém, o papel da comunicação entre as vias de sinalização PI3K/AKT and Wnt/ *β -catenin* no processo EMT precisa ser melhor estabelecido.

Na Figura 4 pode ser visualizado um esquema da via de transdução de sinal associada ao processo de transição epitélio-mesênquima, PI3K e WNT.



Fonte: LARUE e BELLACOSA (2005)

Legenda: Os efeitos do processo EMT estão descritos nas caixas de texto. RTK: Receptor de tirosina-quinase; ROS: Espécies reativas de oxigênio; ILK: Integrin-linked quinase; TGFβ: Fator de crescimento tumoral.

Figura 4 - Esquema da via de transdução de sinal associada ao processo de transição epitélio-mesênquima, PI3K e WNT.

Pesquisadores têm voltado sua atenção para os tratamentos alvo, dirigidos à inibição dessas vias de sinalização. Vários estudos mostraram que mutações oncogênicas somáticas em *PIK3CA*, resultam em p110α (a subunidade catalítica de

PI3K) oncogênico, que é capaz de ativar constitutivamente a cascata de sinalização, ocorrendo em cerca de 25% dos cânceres de mama. A eficácia de uma pequena molécula inibidora de PI3K, o GDC-0941, foi demonstrada em modelo animal, resultando em resposta do tumor ao tratamento (YUAN et al. 2013).

Outros estudos recentes realizados por Meyer et al. (2011) e Liu et al. (2011), citados por MILLER (2012, p.1) demonstraram que a expressão do éxon 20 H1047R mutante de *PIK3CA*, em células epiteliais mamárias luminais, induz a tumorigênese, sugerindo que a mutação de *PIK3CA* seja um evento precoce no câncer de mama.

Em um trabalho anterior do grupo (CASTRO et al. 2008), que analisou as diferenças entre as células das duas lesões (CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI), demonstramos que o padrão de expressão gênica do grupo representante de células epiteliais tumorais do componente *in situ* do CDIS-CDI é semelhante ao grupo de células tumorais do CDI e diferente do grupo de células CDIS puro, cujos aspectos morfológicos são semelhantes ao componente *in situ* do CDIS-CDI. Isso sugeriu que as modificações moleculares das células do componente *in situ* do CDIS-CDI, já estejam presentes antes da manifestação morfológica de invasão e que os genes diferentemente expressos entre os dois grupos de células de lesões pré-invasivas, sejam potenciais preditores de risco de progressão do CDIS puro. Para avaliar os aspectos funcionais do processo de invasão, foi utilizada a plataforma contendo genes das vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT. Um grupo de 57 genes foi selecionado, sendo identificados como genes diferencialmente expressos, classificados como candidatos que podem estar envolvidos nos estágios iniciais do processo de progressão do CDIS, com capacidade de invasão. A lista dos 57 genes mencionados e o resultado de suas expressões gênicas, podem ser visualizados em Anexo 1.

O presente trabalho teve como objetivo, confirmar com outros métodos mais sensíveis, usando grupos adicionais de amostras, os genes previamente selecionados como diferentemente expressos entre os dois grupos de amostras de mesma morfologia e diferentes potenciais malignos (CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI) para identificar potenciais marcadores preditivos de progressão de CDIS puro, ou de prognóstico para CDI. Assim, nós avaliamos 28 genes (*GRB10*, *MAPK8*, *EDN1*, *WISP2*, *CD79A*, *INPP1*, *MYB*, *COL5A1*, *DLL1*, *FANCD2*, *GDAP1*, *ADH4*

HOXA1, HTR2A, ITPKC, MBP, MTA1, NCAM2, NPY, NRG2, OPN1LW, PAX4, PAX6, PRKACG, RELN, TNFRSF8, WNT1 e WNT10B) pertencentes às vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT, previamente identificados pela técnica de cDNA *microarray*, como diferencialmente expressos entre o CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI da mama (CASTRO 2008), através da técnica de RT-PCR quantitativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar potenciais marcadores moleculares de risco de progressão de CDIS por RT-qPCR e validar por imunohistoquímica (IIQ), os candidatos previamente identificados por microarray como diferencialmente expressos entre as células tumorais do CDIS puro e do componente *in situ* associado ao CDI da mama, assim como identificar marcadores prognósticos em CDI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Realizar ensaios de RT-qPCR para os 28 genes (*GRB10*, *MAPK8*, *EDN1*, *WISP2*, *CD79A*, *INPP1*, *MYB*, *COL5A1*, *DLL1*, *FANCD2*, *GDAP1*, *ADH4*, *HOXA1*, *HTR2A*, *ITPKC*, *MBP*, *MTA1*, *NCAM2*, *NPY*, *NRG2*, *OPN1LW*, *PAX4*, *PAX6*, *PRKACG*, *RELN*, *TNFRSF8*, *WNT1* e *WNT10B*) pertencentes às vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT, previamente identificados pela técnica de cDNA *microarray*, como diferencialmente expressos entre o CDIS puro e o componente *in situ* associado ao CDI da mama (CASTRO 2008).
- 2 Avaliar as proteínas codificadas pelos genes que apresentarem nível de expressão concordante com os dados de *microarray*, através da técnica de IIQ em amostras de carcinoma ductal de mama *in situ* puro (CDIS) e do componente *in situ* associado ao invasivo (CDIS-CDI), utilizando *Tissue microarray* (TMA).
- 3 Testar os anticorpos, cujas proteínas apresentarem diferenças na positividade entre os subtipos de carcinoma, para avaliarmos a sua expressão em um grupo de pacientes portadoras de CDIS que apresentaram, após o diagnóstico, um segundo evento, como doença invasiva e/ou metástase. As pacientes que não apresentaram o segundo evento devem ter um *follow-up* de pelo menos 6 anos.
- 4 Testar o potencial dos genes candidatos como biomarcadores prognósticos em CDI, avaliando a expressão proteica na neoplasia invasiva.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras foram obtidas do Biobanco e do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Para a seleção inicial das amostras neoplásicas, o critério de inclusão foi o diagnóstico prévio de carcinoma ductal sem tratamento sistêmico pré-operatório.

Foram selecionadas amostras de tecido congelado: nove amostras CDIS puro, 17 componente *in situ* do CDIS-CDI, 10 CDI e quatro normais (parênquima mamário adjacente à fibroadenoma). As características clinico-patológicas destes casos estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Características clínico-patológicas dos casos selecionados para a identificação por RT-qPCR com ensaio TLDA

Tipo histológico	Amostra	Idade ao Diagnóstico	pTNM	Grau nuclear	Grau de SBR	Marcadores moleculares
Normal	MN14	25	NA	NA	NA	NA
	MN16	29	NA	NA	NA	NA
	MN18	29	NA	NA	NA	NA
	MN19	44	NA	NA	NA	NA
CDIS puro	43A	37	TisN0M0	3	NA	ER -/PR -/P53 +/ HER2 (0)
	44A	44	TisN0M0	2 e 3	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER2 (0)
	46A	43	TisN0M0	3	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER2 (3+)
	49A	58	TisN0M0	3	NA	ER -/ PR -/P53 -/HER2 (3+)
	M60T	65	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)
	M27T	42	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (0)
	M56T	48	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)
	M58T	58	TisN0M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)
	M59T	54	TisN0M0	3	NA	ER-/PR-/ HER2 (3+)
Componente <i>in situ</i> do CDIS-CDI	2A	48	T2N0M0	3	NA	ER +/PR +/P53 +/HER2 (1+)
	25A	34	T1cN0M0	3	NA	ER +/PR +/P53 +/HER2 (3+)
	45A	55	T1N0M0	3	NA	ER -/PR -/P53 +/HER2 (3+)
	66A	44	T4bN1M0	2	NA	ER +/PR +/P53 ND/ HER2 (1+) (-)*
	75A	43	T2N0M0	2	NA	ER -/ PR -/ P53 +/ HER2 (3+)
	83A	48	T2N0M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER2 (2+) (-)*
	85A	73	T3N0M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 -/ HER2 (2+) (-)*
	86A	45	T2N0M0	3	NA	ER +/ PR + P53 +/ HER2 (2+) (-)*
	87A	48	T2N1M0	3	NA	ER -/ PR -/ P53 -/ HER2 (2+) (-)*
	88A	63	T2N0M0	1	NA	ER +/ PR -/ P53 -/ HER2 (2+) (NA)
	3N0	39	T1cN0M0	3	NA	ER +/ PR +/ P53 ND/ HER2 (3+)
	8N0	49	T1cN0M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 ND/ HER2 (0)
	15N1	69	T2N1M0	2	NA	ER +/ PR +/ P53 ND/ HER2 (2+) (-)*
	MIC 25A	54	T4bN2M0	3	NA	ER-/PR-/HER2 (1+)
	MIC 38A	67	T2N2M0	3	NA	ER+/PR+/HER2 (1+)
	MIC 81A	56	T1N2M0	2	NA	ER+/PR+/HER2 (3+)
	MIC151A	56	T2N2aM0	3	NA	ER-/PR-/ HER2 (2+) (+)*
CDI	1B	45	T2N0M0	2	II	ER -/ PR -/P53 -/ HER2 (3+)
	3B	43	T1cN0M0	3	II	ER +/ PR -/ P53 -/ HER2 (3+)
	24B	54	T2N0M0	3	II	ER +/ PR +/ P53 +/ HER2 (3+)
	50B	71	T4N2M0	3	III	ER +/ PR +/ P53 +/ HER2 (2+) (-)*
	53B	43	T2N2M0	3	III	ER +/ PR +/P53 ND/HER2 (2+) (-)*
	56B	ND	T1cN0M0	2	I	ER +/ PR +/ P53 ND HER2 (0)/Ki5%
	63B	54	T3N1M0	3	III	ER -/ PR - P 53 -/ HER2 (1+)
	80B	44	T1N1M0	3	II	ER +/ PR + P53 -/ HER2 (1+)
	81B	31	T2N1M0	3	II	ER -/ PR -/ P53 +/ HER2 (3+)
	MIC177B	43	T2N1M0	3	III	ER-/PR-/HER2 (1+)

Abreviações: CDIS, carcinoma ductal *in situ*; CDIS-CDI, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; CDI, carcinoma ductal invasivo; pTNM, sistema TNM patológico para estadiamento de tumores malignos; RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona; HER2, *human epidermal growth factor receptor type 2*; (-)*, FISH não amplificado; (+)*, FISH amplificado; (ND)*, FISH não determinado; Grau histológico de SBR, sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson; ND, não determinado; NA, não avaliável, TLDA, *Taqman low density array*®.

Nós analisamos todas as lâminas de hematoxilina-eosina (HE) de cada caso, incluindo as arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica e as correspondentes às amostras de tecido congelado retiradas do Biobanco. As lesões CDIS puras foram reclassificadas, seguindo os parâmetros estabelecidos pela WHO e buscamos afastar a possibilidade de presença de microinvasão definida como a invasão do estroma adjacente ao ducto mamário comprometido por CDIS, caracterizada por um ou mais focos microscópicos separados de células neoplásicas infiltrativas, cada um menor ou igual a 1mm de dimensão (PINDER et al. 2012), que eventualmente não tenha sido identificada na ocasião do diagnóstico. Para a reclassificação das amostras de CDI foi utilizado o sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis, ou SBR modificado (ELLIS et al. 2012) (item 1.2).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C.Camargo em 18/01/2011, em processo de número 1488/10.

3.1.1 Critérios de inclusão

As amostras de tecido tumoral selecionadas para este estudo pertencem à pacientes que obedecem os seguintes critérios de inclusão:

- serem do sexo feminino;
- portadoras de câncer de mama, com diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma de tipos histológicos ductal *in situ* (CDIS) puro e/ou ductal *in situ* associado a invasivo (CDIS-CDI).

3.1.2 Critérios de exclusão

- submetidas a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico prévio.

3.2 MICRODISSECÇÃO A LASER

A microdissecção a *laser* é uma metodologia capaz de aumentar a acurácia e a sensibilidade dos estudos moleculares, por possibilitar a obtenção de uma população celular homogênea de um tecido morfológicamente complexo, garantindo que apenas as células de interesse sejam isoladas.

Para a identificação da expressão gênica por RT-qPCR, as amostras foram submetidas à microdissecção a *laser*, utilizando o equipamento Pixcell II Laser Capture Microdissection (LCM) System (Arcturus Systems for Microgenomics ®). Este sistema computadorizado consiste basicamente em um microscópio invertido, onde são acoplados uma fonte de raio *laser* infravermelho de baixa potência, uma câmera e um monitor. A lâmina de vidro contendo o corte histológico da respectiva amostra é fixada ao *chariot* por um mecanismo de sucção a vácuo e acima da lâmina é acoplada uma cápsula de filme termoplástico (*cap*). Com o disparo do feixe de *laser*, o filme termoplástico expande e adere à célula escolhida. Quando o pulso cessa, o filme retrai, levando consigo a célula aderida à superfície do filme. Os disparos podem ser dados, tantos quanto forem necessários, cobrindo a área de interesse para o estudo no corte histológico. Neste trabalho, o número de células capturadas variou entre 1000 a 4000 células/amostra. Uma representação da microdissecção a *laser* pode ser visualizada na Figura 5.

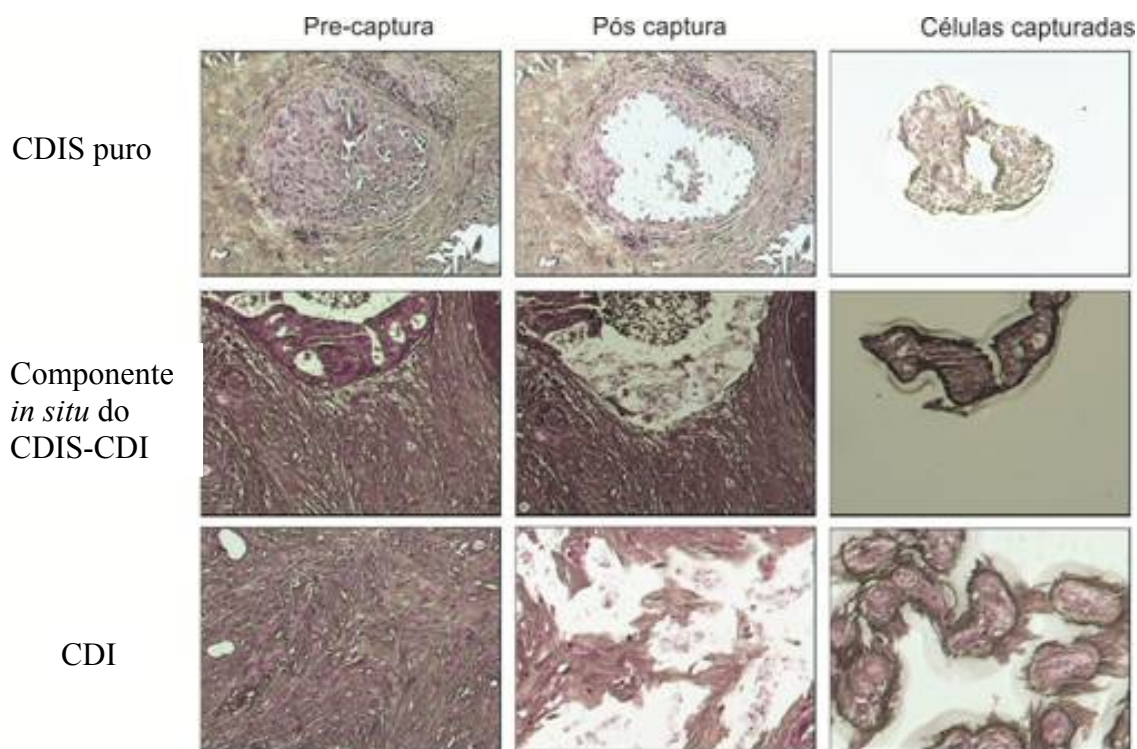


Figura 5 - Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina. Células tumorais epiteliais capturadas de lesões CDIS puras, componente *in situ* do CDIS-CDI e CDI. **Abreviações:** CDIS, carcinoma ductal *in situ*; CDIS-CDI, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; CDI, carcinoma ductal invasivo. Aumento de 100 x.

3.3 EXTRAÇÃO DO RNA DAS CÉLULAS MICRODISSECADAS A LASER

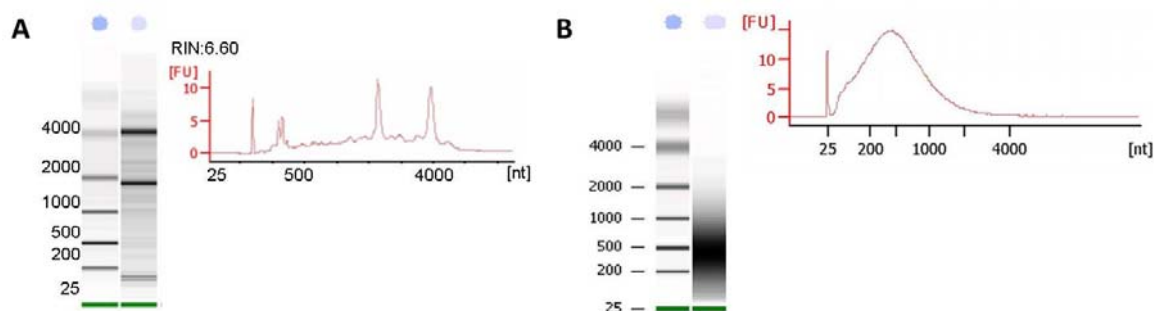
Imediatamente após a microdissecção a *laser*, o RNA total das amostras foi extraído a partir das células presas no *cap*, com *kit* PicoPure RNA Isolation (Acturus®) e tratado com DNase I (Qiagen®), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA total extraído foi avaliada pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies®), utilizando o *kit* RNA 6000 Pico LabChip (Agilent Technologies®). Este equipamento fornece um número de integridade do RNA (*RIN-RNA Integrity Number*) que varia de 0 a 10 (SCHROEDER et al. 2006). Um exemplo da qualidade do RNA total extraído das amostras microdissecadas a *laser* está representado na Figura 6A.

A quantidade de RNA total obtida das células microdissecadas a laser é muito pequena (em torno de picogramas), sendo necessária a realização da amplificação do RNAm para obtenção de quantidade suficiente de material para os experimentos moleculares subsequentes.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (RNAm)

O RNAm foi submetido a dois ciclos de amplificação, conforme descrito em CASTRO et al. (2008). Após a amplificação as amostras devem apresentar um perfil onde a maior concentração de RNA amplificado (RNAa) esteja entre 200 a 600pb. Um exemplo da qualidade do RNAa pode ser visualizado na Figura 6B. O RNAa foi utilizado para a síntese de cDNA. Este, por sua vez, foi utilizado como molde nos experimentos de RT-qPCR.

Segundo um trabalho prévio do 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. 2010).



Fonte: Agilent Technologies (2012)

Figura 6 - Corrida de RNA total e amplificado no equipamento *Bioanalyser*. (A), eletroforese e eletroferograma de RNA total. (B), eletroforese e eletroferograma de RNA amplificado.

3.5 SÍNTESE DE cDNA

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

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

Para a confirmação dos dados do experimento de cDNA *microarray* (CASTRO et al. 2008) por RT-qPCR, foi utilizado o sistema de detecção *TaqMan low density array*® (TLDA).

3.6.1 Confirmação dos dados de cDNA *microarray* utilizando o ensaio TLDA

Dos genes que compuseram a lâmina de vias 2.3K no estudo de cDNA *microarray* de CASTRO (2008), 28 genes pertencentes às vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT, foram selecionados no estudo anterior como diferencialmente expressos entre os grupos correspondentes aos dois tipos de células (CDIS puro e componente *in situ* associado a CDI), apresentando nível de significância $\alpha < 0,05$ e diferença de expressão (*fold change*) >2 . Estes genes foram submetidos ao

ensaio TLDA (*Taqman*® *Low Density Array* – Life Technologies) para confirmar a diferença de expressão entre os grupos de células.

Nove amostras de CDIS puro, 17 amostras de componente *in situ* do CDIS-CDI, 10 amostras CDI e quatro normais (Quadro 3) foram avaliadas através do ensaio TLDA para a pesquisa de expressão dos 28 genes. Os ensaios foram realizados conforme instruções do fabricante, com 20ng totais de cada amostra, no equipamento Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies®).

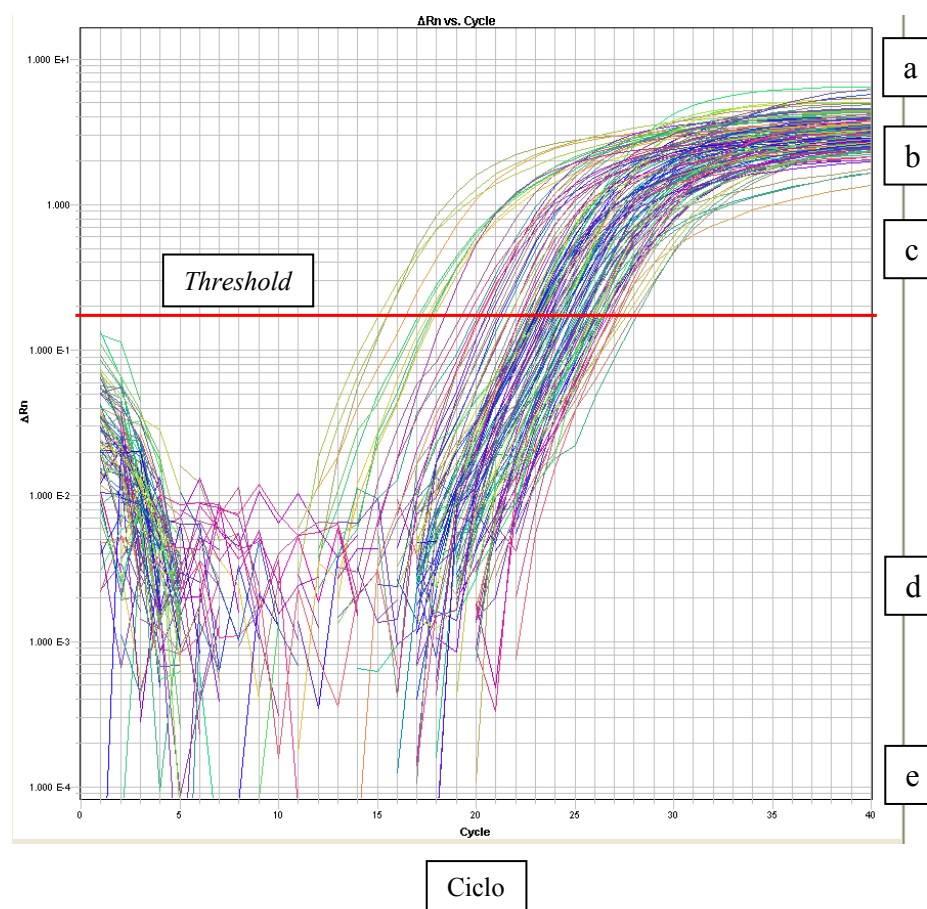
Em nosso estudo utilizamos o ensaio TLDA com placa matriz contendo 384 poços, sendo capaz de realizar 384 reações de RT-qPCR simultaneamente. Os 28 genes foram arranjados juntamente com 61 genes de outros estudos e 6 genes (*RPLP0*, *GUSB*, *18S*, *B2M*, *BCR*, *HPRT1*), cujas expressões foram testadas como genes normalizadores e 1 controle interno, totalizando 96 genes. Assim, em cada placa matriz são avaliadas 4 amostras distintas (Figura 7).

Replicates																									Port	
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A	1
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B	
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C	
2	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	D	2
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F	
3	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	G	3
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	H	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I	
4	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J	4
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	K	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	L	
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	5
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N	
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O	
2	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P	6
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N	
3	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O	7
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	
4	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N	8
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P	

Figura 7 - Representação da placa matriz do ensaio TLDA (formato 384). A placa apresenta quatro regiões idênticas, delimitadas pelos números de 1 a 4, à esquerda. Em cada região estão dispostos 95 genes encomendados (quadrados azuis) e um controle (quadrado cinza). Em cada região é analisada uma amostra distinta. Os números de 1 a 8 à direita, representam as canaletas onde são dispensadas as amostras, sendo que cada amostra foi dispensada em duas canaletas referentes a cada região delimitada.

O *TaqMan low density array*® otimiza a reação configurando o processo em quatro passos. No primeiro passo carregamos a matriz com a amostra de cDNA e *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix*. No segundo passo submetemos a placa à

rotação em centrífuga. No terceiro passo selamos a placa para o líquido não evaporar. No quarto passo a matriz *TaqMan* está pronta para ser executada no instrumento 7900HT. Os níveis relativos de expressão de cada gene são determinados a partir dos dados de fluorescência gerados durante a amplificação, usando o ABI PRISM® 7900HT *Sequence Detection System* ou Applied Biosystems 7900HT, um sistema de quantificação relativa de produtos de RT-qPCR. Um programa computadorizado de bioinformática *SDS RQ Manager* lê o ensaio TLDA, demonstrando em gráficos, a análise dos genes e o *cicle quantification* (Figura 8).



Legenda: Uma curva típica de amplificação tem: (a) Fase Platô; (b) Fase Linear; (c) Fase Geométrica; (d) *Background*; (e) Linha basal.

Fonte: Obtido de Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System. Relative Quantification.

Figura 8 - Demonstração gráfica da análise do gene e o *cicle quantification*.

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

A expressão dos transcritos alvos foi determinada através da quantificação relativa a genes endógenos ou normalizadores. Para a seleção dos 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/>, que calcula uma medida de estabilidade gênica (M). O valor M sugerido pelo programa deve ser menor que 1.5, abaixo do qual se obtêm 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 para a normalização dos valores de expressão. A normalização foi realizada para cada amostra, pela razão entre o valor 2^{-Cq} do gene alvo e 2^{-Cq} do gene normalizador. A partir dos valores normalizados, foi obtido o valor de *fold change* pela comparação entre a média dos valores das amostras do grupo CDIS puro, pela média dos valores das amostras CDIS-CDI e foi também realizado o teste T de Student não pareado. Foram considerados como diferencialmente expressos genes que apresentaram *fold change* $\geq |2|$ e $P < 0,05$.

3.6.3 Fluxograma com o delineamento experimental do estudo

Um resumo sobre as amostras de tecido congelado e as metodologias utilizadas para a obtenção da expressão relativa de RNAm, estão demonstrados no fluxograma representado na Figura 9.

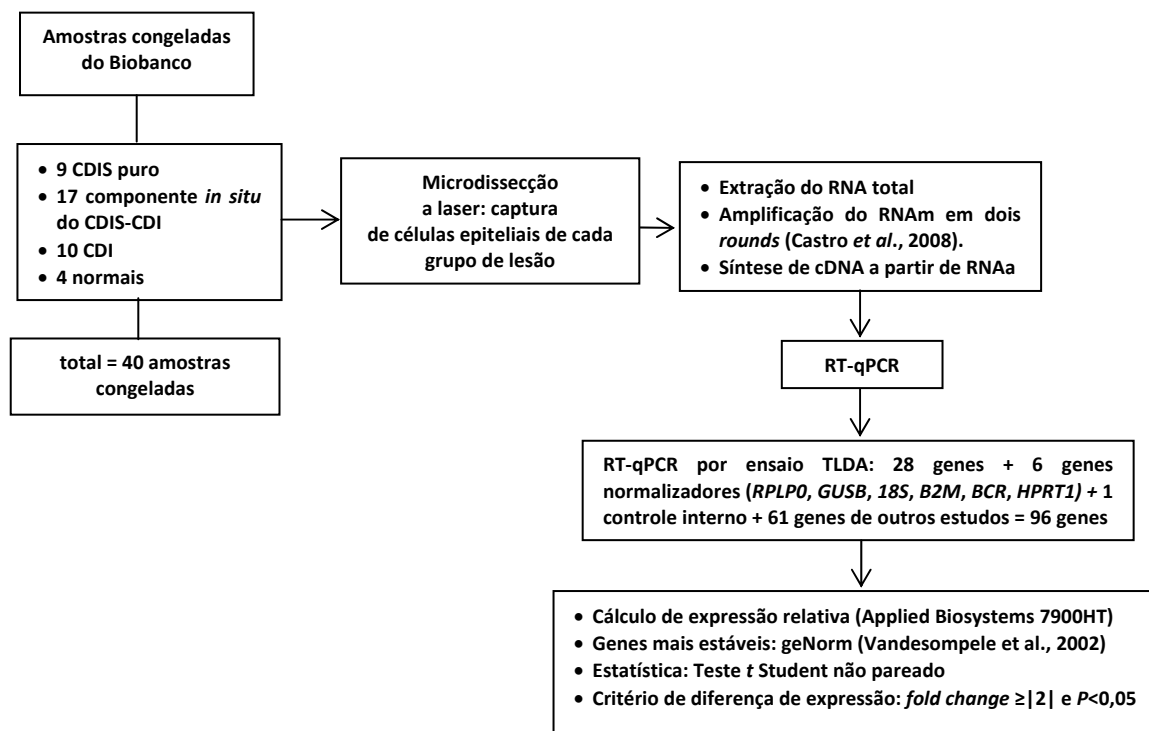


Figura 9 – Fluxograma demonstrativo do delineamento experimental do estudo

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

3.7.1 Construção dos *Tissue Microarrays* (TMAs)

Para a realização das reações IIQs e validação dos achados de RNA por TLDA, foram construídos três *Tissue microarrays* (TMAs). Um deles, denominado TMA- CDIS (1) é composto por 40 amostras de CDIS puro e 37 amostras de CDIS-CDI. Os outros dois TMAs denominados TMA-CDI (2) e (3), contêm 106 e 201 amostras de CDI, respectivamente. Todas as amostras são provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. As áreas representativas da neoplasia, quantitativa e qualitativamente, foram selecionadas em lâmina original corada por hematoxilina-eosina (H.E.) e identificadas nos blocos de parafina doadores (originais), onde foram puncionadas com agulha de um milímetro. Os cilindros obtidos foram transferidos de cada bloco doador para um bloco de parafina receptor (bloco de TMA), como podemos visualizar na Figura 10. Os

cilindros são localizados em posição bidimensional determinada e mapeada, correspondentes a cada caso (paciente).

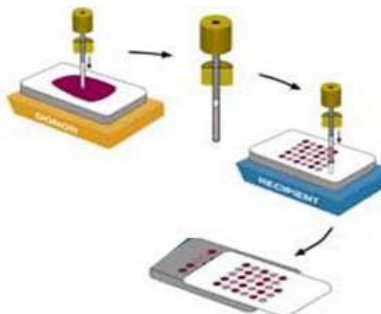


Figura 10 - Esquema demonstrando a montagem do bloco do *tissue microarray* a partir do bloco doador e a lâmina de histologia para a análise.

O mapa com a identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel® (Microsoft, EUA), permitindo a localização exata de cada caso. As amostras foram coletadas em duas diferentes áreas do bloco original para confecção de duplicatas no bloco receptor. O bloco de TMA foi então, submetido a cortes com 3 μ m de espessura, em micrótomo rotativo e, à seguir colocados sobre lâminas de vidro adesivas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA) para a realização de coloração por Hematoxilina-eosina (H.E.) e das reações IIQs. Após a coloração das respectivas lâminas, visualizamos os *cores* em duplicata, correspondentes a cada caso (Figura 11).

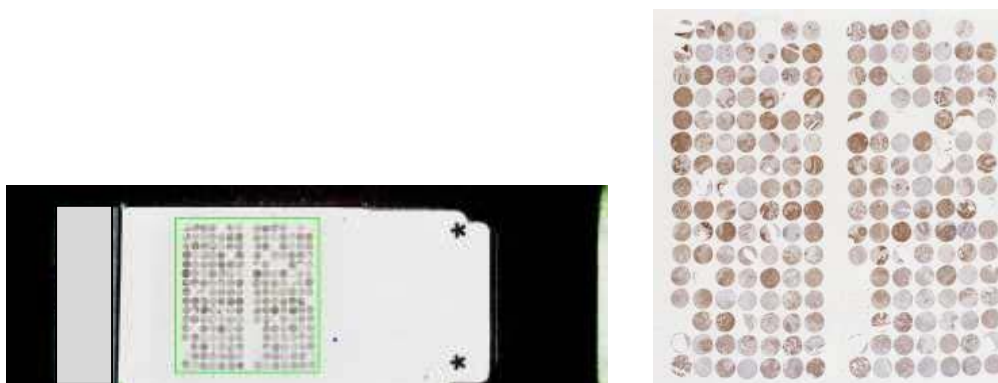


Figura 11 - Lâmina de imunohistoquímica demonstrando a representação dos *cores* de cada caso, em duplicata.

3.7.2 Caracterização dos TMAs 1, 2 e 3 com os marcadores imunoistoquímicos preditivos e prognósticos estabelecidos

Os TMAs 1,2 e 3 foram submetidos à reação IIQ, previamente realizada no estudo de ABUÁZAR (2012), para a análise da expressão dos marcadores hormonais RE (anti-ER, monoclonal, clone SP1, produzido em coelho, DAKO®) e RP (anti-PR, monoclonal, clone PgR636, produzido em camundongo DAKO®), do marcador de proliferação celular Ki67 (anti-Ki67, monoclonal MIB-1 DAKO®), assim como do marcador HER2 (anti-HER2, policlonal, produzido em coelho, 1:1000, DAKO®). A expressão imunoistoquímica dos receptores hormonais (RE e RP) foi avaliada pelo sistema de escore de Allred (Tabela 1).

Tabela 1 - Sistema de escore de Allred para avaliação de expressão nuclear

Sistema de Allred					
Intensidade	Proporção de núcleos corados (%)				
	<1(0)	1 a 10(2)	> 10 a 33(3)	>33 a 66(4)	>66 a 100(5)
Fraca (1)	neg	3	4	5	6
Intermediária (2)	neg	4	5	6	7
Forte (3)	neg	5	6	7	8

* O escore total é obtido com a somatória da proporção de núcleos marcados mais a intensidade. O escore total de 0 a 2 é considerado negativo. O escore total de 3 a 8 é positivo, se núcleos corados em $\geq 1\%$ da neoplasia.

A expressão imunoistoquímica de RE, RP e HER2 foi interpretada segundo as recomendações da *American Society of Clinical Oncology* e do *College of American Pathologists* (WOLFF et al. 2007; HAMMOND et al. 2010).

Para os TMAs 2 e 3, foi também feita a análise de EGFR (monoclonal, 1:80, Novocastra®) e CK5/6 (pronto para uso, Dako®). A positividade de EGFR e CK5/6 foi considerada quando observada em pelo menos 1% das células neoplásicas.

A expressão imunoistoquímica de Ki67 foi avaliada pela proporção de núcleos corados. O *cutoff* utilizado para a definição de baixa ou alta expressão da proteína na reação imunoistoquímica foi de 15%, baseado no estudo molecular de CHEANG et al. (2009).

As amostras de CDI foram classificadas como Luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2-, Ki-67-), Luminal B (ER+ e/ou PR+, HER2+ e/ou Ki-67+), superexpressor

de 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).

A caracterização das amostras dos TMAs 1,2 e 3, com as frequências dos marcadores imunistoquímicos preditivos e prognósticos mencionados acima, está descrita em Anexos 2 e 3.

3.8 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Realizamos a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em todas as amostras dos TMAs 1, 2 e 3, ou seja, tanto nas amostras de CDIS (TMA1), como nas amostras de CDI (TMAs 1 e 2), para a avaliação da amplificação do gene *HER2* e obtenção do resultado final do *status* HER2, segundo as recomendações da *American Society of Clinical Oncology* e do *College of American Pathologists* (WOLFF et al. 2007).

O protocolo da Hibridação *in situ* Fluorescente está descrito em Anexo 4.

3.8.1 Critérios de avaliação das amostras pelo método de FISH

As lâminas de FISH foram analisadas em microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (Olympus® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com os filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com uma câmera colorida digital refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio acima, usando o programa para análise de imagem Image Pro®Plus versão 6.0 (Olympus®).

As células normais presentes na amostra de tecido são utilizadas para a avaliação da qualidade da reação, contendo 2 sinais fluorescentes vermelhos, correspondentes ao gene *HER2* e 2 sinais fluorescentes verdes, correspondentes ao cromossomo 17. Os critérios utilizados para avaliação das amostras nos TMAs foram baseados nas recomendações para o teste HER2 em câncer de mama, descritas no *guideline* da ASCO/CAP 2007 (item 1.5.5).

3.9 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA (IIQ) PARA A VALIDAÇÃO DOS GENES SELECIONADOS POR RT-qPCR

No presente estudo realizamos as reações imunoistoquímicas para a validação dos genes *GRB10*, *MAPK8*, *EDN1*, *INPP1*, *CD79A* e *WISP2*, com os seus respectivos anticorpos comerciais (Quadro 4) em lâminas dos TMAs 1, 2 e 3. Utilizamos controles positivos e negativos para cada reação analisada. Como controles positivos, foram utilizados tecidos normais e tumorais conhecidos por expressarem as proteínas de interesse, segundo as informações disponíveis no The Human Protein Atlas (2012a). (Quadro 5). Um controle negativo, feito pela omissão do anticorpo primário, foi incluído em todas as reações.

Quadro 4 - Anticorpos utilizados para as reações imunoistoquímicas, clonalidade, diluições e marcas.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
CD79a	policlonal em coelho	1:50	Sigma cat# HPA017748, St Louis, MO, EUA
WISP2	policlonal em coelho	1:25	Abcam cat#ab38317, Cambridge, MA, EUA
MAPK8/JNK1	policlonal em coelho	1:50	Lifespan cat# LS-C48640/38313
EDN1	policlonal em coelho	1:100	Sigma cat# HPA031976
GRB10	policlonal em coelho	1:250	NovusBiologicals cat#NB100-88153, Littleton, CO, EUA
INPP1	policlonal em coelho	1:200	Sigma cat# HPA36698

A localização da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas nas células dos tecidos normal e tumoral, está descrita no Quadro 5.

Quadro 5 - Anticorpos utilizados, tecido controle normal e tumoral e localização subcelular. Os itens em “negrito” foram utilizados neste estudo.

Anticorpos	Tecido Controle Normal	Tecido Controle Tumoral	Localização Subcelular
CD79A	hematopoiético, digest	linfoma, mama fraco	Citoplasma
GRB10	endomét, mama; digest	endométrio, colon, mama	núcleo, - citoplasma
WISP2	digestivo, mama	glioma, mama fraco	núcleo, citoplasma
MAPK8/JNK1	digestivo; mama	mama, endométrio	Citoplasma
EDN1	digestivo, mama	ovário, colon, endom, mama	Citoplasma
INPP1	digestivo (intestino)	hepático , pancreático	centrossomo, citoplasma

Fonte: The Human Protein Atlas (2012a)

O protocolo das reações imunoistoquímicas (IIQs) está descrito no Anexo 6.

3.9.1 Critérios para leitura das reações IIQs

Os resultados da reação imunoistoquímica foram analisados em microscópio óptico e classificados em relação à intensidade da reação e à porcentagem de células positivas. As marcações citoplasmática e/ou nuclear foram consideradas suficientes para a análise, quando as células neoplásicas preenchem pelo menos 10% do diâmetro de um *core*/caso na lâmina do TMA, contendo os critérios histológicos de elegibilidade para o diagnóstico de CDIS (TMA 1) e CDI (TMAs 2 e 3).

A expressão da proteína codificada pelos genes analisados foi observada no citoplasma e/ou núcleo das células neoplásicas.

Para a análise da expressão imunoistoquímica citoplasmática foi utilizado um sistema de escore combinado entre intensidade de expressão proteica e porcentagem das células coradas, sendo a categorização da porcentagem de células coradas, baseada no estudo de CHIAPPETTA et al. (2007):

Intensidade:

0- negativo 1- Fraco 2- Moderado 3-Forte

Porcentagem de células coradas:

0 = <1% 1 = 1-10% 2 = 11-50% 3 = 51-75% 4 = 76-100%

A somatória dos critérios de intensidade de expressão da proteína e da porcentagem de células positivas observadas em cada amostra (“core”) resulta em um escore combinado, assim analisado:

Negativo = 0-2

Positivo fraco = 3-4 e 5 = 1+4

Positivo forte = 5 = 2+3 e 6-7

A avaliação da expressão imunoistoquímica citoplasmática foi realizada em 9 diferentes categorizações de escores: **1**-(0 x 2-7); **2**-(0-2 x 3-7); **3**-(0-3 x 4-7); **4**-(0-4 x 6-7), sendo negativos os escores (0-4) e 5(1+4) e positivos os escores (6-7) e 5 (2+3); **5**-(0-5 x 6-7); **6**-(0-6 x 7). Nas três seguintes categorizações, observamos

apenas a intensidade de expressão, como descrito em ABUÁZAR (2012) (intensidade: 0-negativo; 1-positivo fraco; 2- moderado; 3-forte): **7**-(0 x 1-3); **8**-(0-1 x 2-3); **9**-(0-2 x 3).

A análise final de cada caso levou em consideração o maior escore combinado obtido entre a avaliação dos 2 *cores* correspondentes ao caso, nas duplicatas dos TMAs (item 3.7.1).

Para a análise da expressão imunoistoquímica nuclear foi utilizado um sistema de escore baseado no sistema de Allred, segundo a Tabela 1.

3.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.10.1 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 calculados sem o logaritmo na base 2. Para o teste T de Student, os valores de expressão relativa foram calculados com logaritmo na base 2.

3.10.2 Análise dos resultados de Imunoistoquímica

As informações histopatológicas e dos marcadores moleculares foram inseridas em banco de dados específico confeccionado no programa “Excel 2003 – Microsoft Office”. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* estatístico SPSS 18.0 for Windows (Statistical Package for Social Science, SPSS 18.0). O teste de frequências do qui-quadrado de *Pearson* 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, com intuito de evitar distorções de significância estatística.

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 CDIS puro e do componente *in situ* do CDIS-CDI

O estudo prévio de CASTRO et al. (2008) utilizou uma plataforma customizada contendo 1.854 genes (plataforma 2.3k) em ensaios de cDNA microarray e selecionou 57 genes como diferencialmente expressos entre as células epiteliais capturadas de lesões pré-invasivas (CDIS puro e componente *in situ* associado a CDI). Da lista de 57 genes selecionados no estudo de CASTRO (2008), nós escolhemos 28 genes (*GRB10*, *MAPK8*, *EDN1*, *WISP2*, *CD79A*, *INPP1*, *MYB*, *COL5A1*, *DLL1*, *FANCD2*, *GDAPI*, *ADH4*, *HOXA1*, *HTR2A*, *ITPKC*, *MBP*, *MTA1*, *NCAM2*, *NPY*, *NRG2*, *OPN1LW*, *PAX4*, *PAX6*, *PRKACG*, *RELN*, *TNFRSF8*, *WNT1* e *WNT10B*) que participam de vias de transdução de sinal, para avaliá-los por RT-qPCR, usando algumas amostras do estudo anterior, além de amostras adicionais representativas dos dois grupos de lesões, com o intuito de identificar genes mais robustos. A escolha dos genes foi determinada pela disponibilidade de sondas *TaqMan* para a realização do ensaio TLDA (*TaqMan® Low Density Arrays*) e de anticorpos comerciais para validação por IIQ. Nove amostras CDIS puro e 17 amostras do componente *in situ* do CDIS-CDI foram microdissecadas a *laser* (item 3.2), o RNA foi extraído (item 3.3), amplificado (item 3.4), convertido em cDNA (item 3.5) e usado para avaliação da expressão por RT-qPCR (item 3.6) por ensaio TLDA.

No Quadro 3 do item 3.1 são apresentadas as amostras de tecido congelado utilizadas para o ensaio TLDA.

Para o cálculo de expressão relativa, foi utilizado o gene normalizador *HPRT1*, mais estável segundo a ferramenta geNorm, descrita no item 3.6.2. Dos 28 genes analisados, 20 apresentaram dados confiáveis nos ensaios de TLDA. Destes,

14 (70%) confirmaram os dados de expressão do estudo anterior, apresentando *fold change* $\geq |2|$. É importante ressaltar que 13 dos 14 genes foram mais expressos no grupo de células capturadas de CDIS puro. Destes, 4 (*GRB10*, *MAPK8*, *INPP1*, *EDN1*) apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) e 2 (*CD79A* e *WISP2*) apresentaram diferença de expressão com p valor de 0,05, próximo da significância. Os quatro genes (*GRB10*, *MAPK8*, *INPP1*, *EDN1*) com dados de expressão mais robustos foram então selecionados para avaliação por IIQ. A Tabela 2 demonstra os 28 genes analisados por RT-qPCR e os resultados do cálculo da expressão relativa representada pelo *fold change*. Os resultados do p valor assinalados (*) correspondem aos genes com *fold change* $\geq |2|$ e $p < 0,05$, como observamos abaixo.

Tabela 2 - Lista dos 28 genes avaliados pelo sistema de detecção TLDA

Genes	<i>Fold Array</i> (in situ puro/ in situ associado) (CASTRO 2008)	<i>Fold RT-qPCR</i> (in situ puro/ in situ associado)	p-valor RT-qCR(in situ puro/ in situ associado)
ADH4	3,21	ND	ND
CD79A	3,49	3,86♦	0,05**#
COL5A1	2,51	-1,68	0,64
DLL1	2,60	6,58♦	0,68
EDN1	2,48	5,76♦	0,03*
FANCD2	5,53	8,85♦	0,06
GDAP1	-3,68	1,05	0,61
GRB10	3,51	4,40♦	0,01*
HOXA1	3,94	ND	ND
HTR2A	4,09	1,72	0,88
INPP1	2,62	8,56♦	0,0012*
ITPKC	4,95	3,91♦	0,2
MAPK8	3,71	2,00♦	0,04*
MBP	2,97	1,58	0,57
MTA1	4,43	1,17	0,22
MYB	-3,16	-2,54♦	0,49
NCAM2	3,03	-1,86	0,58
NPY	3,17	ND	ND
NRG2	3,34	98,24♦	0,15
OPN1LW	5,27	ND	ND
PAX4	2,75	ND	ND
PAX6	3,17	8,98♦	0,21
PRKACG	2,67	6,83♦	0,51
RELN	3,50	6,97♦	0,69
TNFRSF8	3,47	ND	ND
WISP2	3,24	4,28♦	0,05**#
WNT1	2,95	ND	ND
WNT10B	2,62	ND	ND

Observam-se os 14 genes que apresentaram *fold change* $\geq |2|$ (♦), sendo que 4 genes apresentaram *fold change* $\geq |2|$ e $p < 0,05$ (*) e 2 genes com p valor = 0,05 (**)(#) próximo da significância. Legenda: ND – Amplificação do gene não detectada

Os gráficos de expressão relativa dos 14 genes analisados por RT-qPCR pelo ensaio TLDA são apresentados no Anexo 7.

Os gráficos de expressão relativa dos 4 genes validados por RT-qPCR através do ensaio TLDA demonstram maior expressão no CDIS puro e são visualizados na Figura 12.

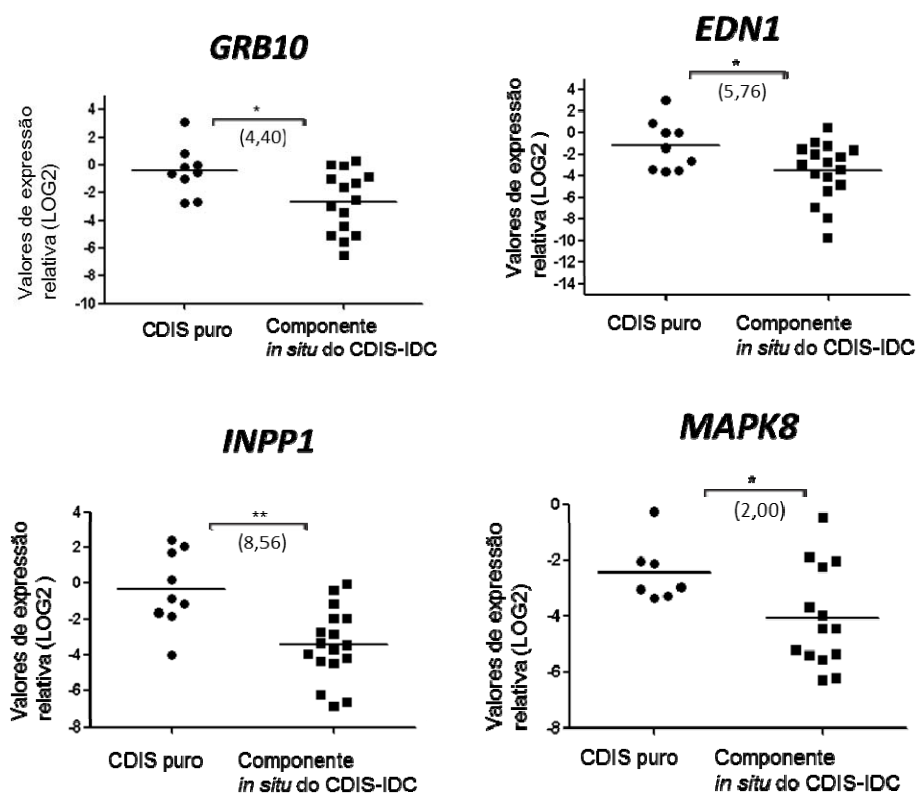


Figura 12 - Genes com dados de expressão obtidos por RT-qPCR concordantes com dados do estudo anterior, obtidos por cDNA *microarray*. Gráfico dos dados de expressão relativa obtidos por RT-qPCR através do sistema TLDA. Os valores de expressão gênica foram calculados com logaritmo na base 2. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Os gráficos representativos do resultado da expressão relativa (*fold change*) do RNAm dos 14 genes analisados por RT-qPCR pelo ensaio TLDA, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray*, foram também obtidos, considerando apenas as amostras com Grau nuclear 3 do CDIS puro (9 amostras) e do componente *in situ* associado ao CDI (9 amostras). Observamos que dois genes (*GRB10* e *INPP1*) apresentaram maior expressão no CDIS puro, quando comparado ao componente *in situ* do CDIS-CDI, com *p* valor

estatisticamente significativo de 0,03* e 0,0054**, respectivamente. Estes gráficos são apresentados no Anexo 8.

O gráfico representativo do resultado da expressão relativa (*fold change*) do RNAm de *GRB10* das amostras nos diferentes grupos de lesões ao longo da progressão (normal, CDIS puro, componente *in situ* do CDIS-CDI e CDI), obtido por RT-qPCR com o ensaio TLDA e o *p* valor, estão descritos no Anexo 9. Observamos a maior expressão de *GRB10* no CDIS puro, quando comparado ao componente *in situ* do CDIS-CDI, com $p=0,01^*$.

4.2 RESULTADOS DA IIQ DOS GENES SELECIONADOS NAS AMOSTRAS CDIS

4.2.1 Seleção de candidatos para avaliação imunoistoquímica

Os 4 genes que apresentaram $fold\ change \geq |2|$ e $p < 0.05$ por RT-qPCR através do ensaio TLDA, mais expressos no grupo de amostras CDIS puro (*GRB10*, *MAPK8*, *INPP1*, *EDNI*), foram selecionados para serem avaliados por IIQ em TMA (descrito no item 3.7.1), com a finalidade de avaliarmos a expressão proteica em amostras de CDIS puro e em amostras do componente *in situ* de de CDIS-CDI. As condições de padronização e localização da marcação de cada anticorpo são visualizadas nos Quadros 4 e 5.

No Quadro 6 descrevemos resumidamente a função de cada um dos 4 genes selecionados. A descrição da localização dos genes no cromossomo pode ser observada em Anexo 11.

Quadro 6 - Descrição dos genes com dados de expressão concordantes entre RT-qPCR e cDNA *microarray*, escolhidos para a avaliação por IIQ.

Gene	Função
<i>GRB10</i>	<i>GRB10 (growth factor receptor-bound protein 10)</i> é uma proteína multi-modular adaptadora que interage com receptores transmembrana tirosina-quinase e com moléculas sinalizadoras, resultando em supressão de crescimento celular
<i>MAPK8</i>	<i>MAPK8 (mitogen-activated protein kinase 8)</i> é um membro da família <i>MAP quinase</i> que atua como ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos, com envolvimento em processos celulares como proliferação, diferenciação, regulação da transcrição e desenvolvimento
<i>INPP1</i>	<i>INPP1 (inositol polyphosphate-1-phosphatase)</i> é um fator de transcrição regulador de sítios de ligação que codifica a enzima inositol polifosfato-1-fosfatase, uma das enzimas envolvidas na via de sinalização do fosfatidilinositol
<i>EDN1</i>	<i>EDN1 (endothelin 1)</i> codifica uma proteína capaz de secretar o peptídeo endotelin 1, um potente vasoconstrictor produzido por células endoteliais vasculares. A sua expressão promove um fenótipo pro-tumorigênico, atuando em células epiteliais e estromais adjacentes

4.2.2 Avaliação da expressão das proteínas codificadas pelos 4 genes selecionados por RT-qPCR em lesões CDIS puras e no componente *in situ* do CDIS-CDI do TMA 1

As proteínas codificadas pelos 4 genes selecionados para análise por IIQ (*GRB10*, *MAPK8*, *INPP1*, *EDN1*) foram avaliadas no TMA (1) composto por 77 amostras independentes de CDIS [(40 amostras de CDIS puro e 37 amostras do componente *in situ* do CDIS-CDI (item 3.7.1)]. As amostras foram avaliadas em duplicatas.

Para a análise citoplasmática, as amostras foram categorizadas como negativas [escores 0-4 e 5 (1+4)] e positivas [escores 6-7 e 5 (2+3)], conforme descrito no item 3.11.1.

A expressão citoplasmática de *GRB10* foi mais observada em lesões CDIS puro, com significância estatística ($P=0,01^*$), concordando com os resultados obtidos nas análises de RNAm. Foram considerados avaliáveis um total de 33 casos CDIS puro. Destes, 15 casos (45,5%) apresentaram expressão imunoistoquímica citoplasmática negativa de *GRB10* e 18 casos (54,5%) foram *GRB10* positivos. Foram considerados avaliáveis 25 casos correspondentes ao componente *in situ* do CDIS-CDI, dos quais 19 (76%) apresentaram expressão negativa de *GRB10* e em 6 deles (24%), a expressão foi positiva. Para as demais proteínas analisadas (*MAPK8*,

INPP1 e EDN1), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre estas duas lesões pré-invasivas. Os resultados referentes à distribuição da expressão imunohistoquímica dos anticorpos avaliados nos dois grupos histológicos de CDIS (CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI), com a categorização de escores acima descrita, são visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Expressão imunohistoquímica citoplasmática de GRB10, MAPK8, INPP1 e EDN1 em um TMA composto por lesões CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI

Proteína	Grupos de lesões CDIS	Análise imunohistoquímica n (%) ¹		P
		negativo	positivo	
GRB10	CDIS puro	15 (45,5)	18 (54,5)	0,01*
	Componente <i>in situ</i> do CDIS-CDI	19 (76,0)	6 (24,0)	19 (76,0)
MAPK8	CDIS puro	17 (53,1)	15 (46,9)	0,35
	Componente <i>in situ</i> do CDIS-CDI	12 (41,4)	17 (58,6)	12 (41,4)
INPP1	CDIS puro	29 (100)	0 (0)	NA
	Componente <i>in situ</i> do CDIS-CDI	28 (100)	0 (0)	
EDN1	CDIS puro	19 (57,6%)	14 (42,4)	0,84
	Componente <i>in situ</i> do CDIS-CDI	16 (55,2)	13 (44,8)	16 (55,2)

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

4.2.3 A proteína codificada pelo gene *GRB10*

Proteínas adaptadoras geralmente contêm vários domínios dentro da sua estrutura, que permitem interações específicas com várias outras proteínas.

A proteína GRB10 (“Growth factor receptor-bound protein 10”) pertence à Família de Proteínas de Ligação Grb7, que é constituída pelas proteínas GRB7, GRB10 e GRB14 (DALY 1998). Esta proteína tem sido estudada na espécie humana, cuja principal função é de regular a ativação de vias intracelulares, ativadas pelos receptores tirosina-quinase. Os receptores mais estudados, os domínios que formam a proteína, as interações químicas e as isoformas reconhecidas estão mencionados no Anexo 13.

4.2.4 Ensaio de Western Blot para análise da expressão da proteína GRB10

Utilizamos 50ug de extrato celular da linhagem MCF-7 para testar os anticorpos GRB10 e GAPDH. O anticorpo GAPDH foi usado como um controle positivo. As diluições utilizadas para os anticorpos primário e secundário foram 1:500 e 1:5000, respectivamente. O ensaio de Western Blot foi revelado por detecção quimioluminescente. A banda de peso molecular 67,23 KDa obtida, corresponde ao tamanho da proteína GRB10, demonstrando que o anticorpo marca especificamente a proteína GRB10. Na Figura 13 demonstramos a especificidade do anticorpo pela proteína GRB10.

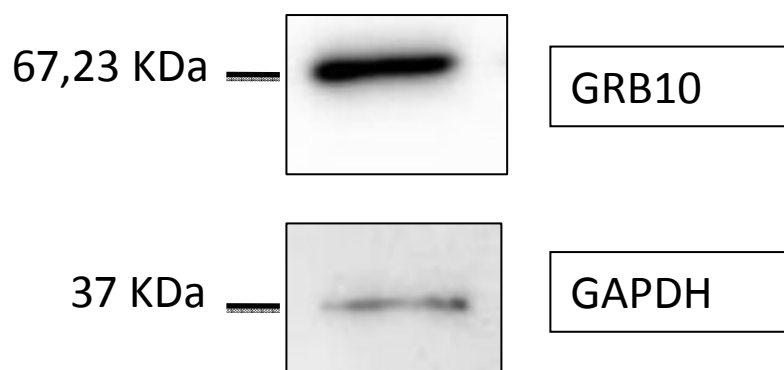


Figura 13 - Demonstração da especificidade do anticorpo pela proteína GRB10 com a presença de uma única banda.

4.2.5 Associação entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e as variáveis clinicopatológicas no TMA CDIS (1)

Com base nos resultados demonstrados na Tabela 25, foi avaliada a associação entre a marcação citoplasmática de GRB10 categorizada como negativa [escores 0-4 e 5 (1+4)] e positiva [escores 6-7 e 5 (2+3)] e as variáveis clínico-patológicas disponíveis para as amostras analisadas.

Foram analisados 58 casos na associação entre a presença de marcação citoplasmática de GRB10 no componente *in situ* e a presença ou não, de invasão associada na lesão, como já foi demonstrado na Tabela 25. Observamos uma associação positiva entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e ausência de invasão associada, apresentando em um maior número de casos CDIS

puro (54,5%), quando comparado ao componente *in situ* do CDIS-CDI (24,0%), com diferença estatística significativa entre os dois grupos de lesões, com p valor = 0,01*.

Foram considerados avaliáveis 52 casos na associação entre a presença de marcação citoplasmática de GRB10 e o subtipo histológico de CDIS. Observamos que a expressão imunistoquímica é mais freqüente no subtipo não comedo, em 45,7% dos casos, quando comparado com o subtipo comedo, com uma diferença estatística não significativa, porém marginal em relação à significância.

Foram considerados avaliáveis 53 casos na associação entre a presença de marcação citoplasmática de GRB10 e os graus nuclear e histológico de CDIS. Observamos que a expressão imunistoquímica é mais frequente no CDIS não alto grau, em 52% dos casos, quando comparado com o CDIS alto grau, com uma diferença estatística não significativa, porém marginal em relação à significância.

Foram considerados avaliáveis 50 casos na associação entre a marcação citoplasmática de GRB10 e a expressão positiva ou negativa do RE. Observamos que a expressão citoplasmática positiva ou negativa de GRB10 distribuiu-se igualmente (em 50%) entre os casos com expressão positiva de RE, com uma diferença estatística não significativa, porém marginal em relação à significância.

Foram considerados avaliáveis 52 casos na associação entre a marcação citoplasmática de GRB10 e o *status* de HER2. Observamos que a expressão citoplasmática positiva de GRB10 é mais frequente (em 53,3% dos casos), quando o *status* HER2 é negativo, com uma diferença estatística não significativa, porém marginal em relação à significância.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de marcação citoplasmática de GRB10 e as demais variáveis clínico-patológicas disponíveis para as amostras analisadas. Todos os resultados desta associação podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 - Associação entre expressão citoplasmática de GRB10 e as características clinicopatológicas no TMA (1) composto por lesões *in situ*.

Variável	Categoria	GRB10 n(%) ¹		P
		Negativo	Positivo	
Invasão associada	não	15 (45,5)	18 (54,5)	0,01*
	sim	19 (76,0)	6 (24,0)	
Idade (mais estratificada)	≤30	1 (100,0)	0 (0,0)	0,29
	31-50	12 (52,2)	11 (47,8)	
	51-80	13 (76,5)	4 (23,5)	
	>80	1 (100,0)	0 (0,0)	
Idade (menos estratificada)	≤35	2 (100,0)	0 (0,0)	0,10
	36-50	11 (50,0)	11 (50,0)	
	>50	14 (77,8)	4 (22,2)	
Subtipo histológico	Não comedo	25 (54,3)	21 (45,7)	0,07
	Comedo	6 (100,0)	0 (0,0)	
Grau nuclear	Não alto grau	12 (48,0)	13 (52,0)	0,08
	Alto grau	20 (71,4)	8 (28,6)	
Grau histológico	Não alto grau	12 (48,0)	13 (52,0)	0,08
	Alto grau	20 (71,4)	8 (28,6)	
Receptor de estrógeno	Negativo	14 (77,8)	4 (22,2)	0,05
	Positivo	16 (50,0)	16 (50,0)	
Receptor de progesterona	Negativo	16 (66,7)	8 (33,3)	0,29
	Positivo	13 (52,0)	12 (48,0)	
Status de HER2	Negativo	14 (46,7)	16 (53,3)	0,08
	Indeterminado	4 (100,0)	0 (0,0)	
	Positivo	12 (66,7)	6 (33,3)	
Ki67 (classificação mais estratificada)	Negativo (0%)	12 (70,6)	5 (29,4)	0,65
	Baixa expressão (1-15%)	16 (57,1)	12 (42,9)	
	Alta expressão (> 15%)	2 (67,7)	1 (33,3)	
Ki67 (classificação menos estratificada)	Expressão ≤ 15%	28 (62,2)	17 (37,8)	> 0,99
	Expressão > 15%	2 (66,7)	1 (33,3)	

(1) Percentual considerando número de casos avaliáveis; (*) $P < 0.05$. Abreviações: HER2, *Human epidermal growth factor receptor type 2*.

A análise estatística da expressão citoplasmática das 4 proteínas estudadas (GRB10, MAPK8, INPP1 e EDN1) nas lesões CDIS puras e no componente *in situ* do CDIS-CDI, foi também realizada com outras categorizações entre os escores de expressão protéica [negativo (escore 0) x positivo (escore 2-7); negativo (escore 0-2) x positivo (escore 3-7); negativo (escore 0-3) x positivo (escore 4-7); negativo (escore 0-5) x positivo (6-7); negativo (escore 0-6) x positivo (7)], além de três categorizações (0 x 1-3); (0-1 x 2-3) e (0-2 x 3), segundo foi descrito no item 3.11.1 e não apresentaram associação estatisticamente significativa.

4.2.6 Análise da expressão imunoistoquímica nuclear das proteínas GRB10, MAPK8, INPP1 e EDN1 no TMA CDIS (1)

Para a análise da expressão nuclear, utilizamos um sistema de escore, onde a proporção de núcleos marcados baseia-se no sistema de Allred. O escore total é obtido com a somatória da proporção de núcleos marcados mais a intensidade de coloração (item 3.7.2; Tabela 1), variando entre 0 e 8. As amostras foram assim categorizadas: negativo (escore 0) x positivo (escore 2-8); negativo (escore 0-2) x positivo (escore 3-8); negativo (escore 0-3) x positivo (escore 4-8); negativo (escore 0-4) x positivo (escore 5-8); negativo (escore 0-5) x positivo (escore 6-8); negativo (escore 0-6) x positivo (escore 7-8); negativo (escore 0-7) x positivo (escore 8).

Não foram observadas diferenças na expressão nuclear de GRB10, MAPK8, INPP1 e EDN1 entre os grupos CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-IDC. No entanto, observamos a presença de expressão nuclear em GRB10, MAPK8 e INPP1 mais frequentemente do que em EDN1, cuja expressão nuclear da proteína foi observada em apenas 10 casos de CDIS.

4.2.7 Demonstração fotográfica microscópica da localização e intensidade de expressão de GRB10 nos grupos de lesões que compõem o TMA 1 (CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI)

A localização da marcação imunoistoquímica de GRB10 é citoplasmática e/ou nuclear, nas células dos tecidos normal e tumoral, como descrevemos na Quadro 5 (item 3.11), não sendo observada marcação de membrana citoplasmática.

A intensidade de expressão da proteína GRB10 no citoplasma e no núcleo das células epiteliais ductais do tecido mamário normal, variou de fraca a moderada. Demonstramos a expressão imunoistoquímica de GRB10 com intensidade moderada e presente em alguns núcleos, nas células ductais normais na Figura 14 (A e B).

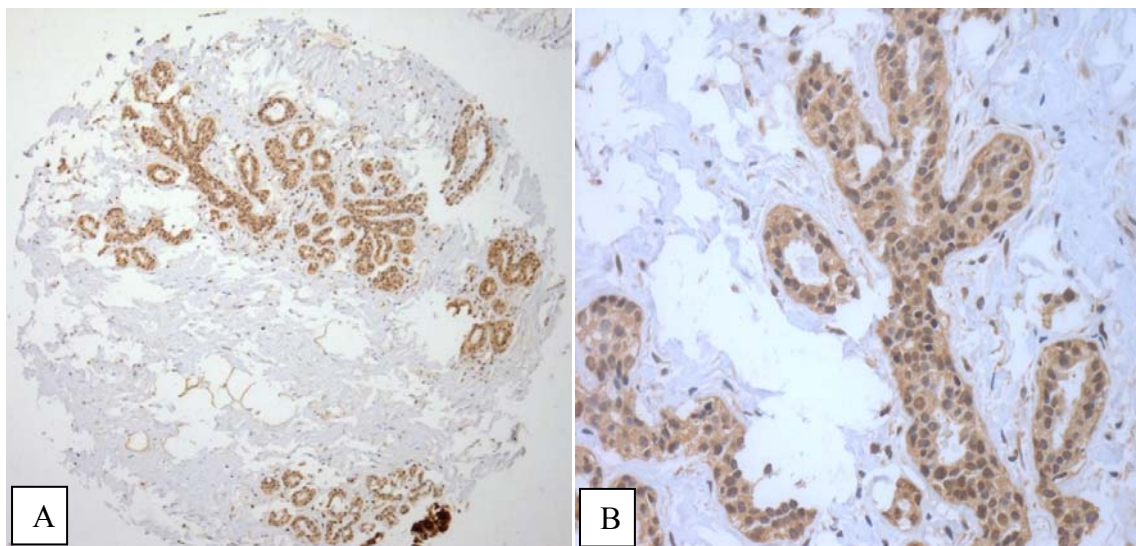
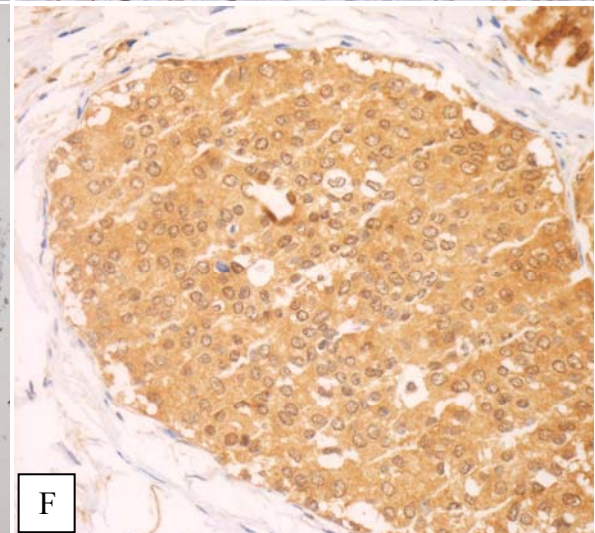
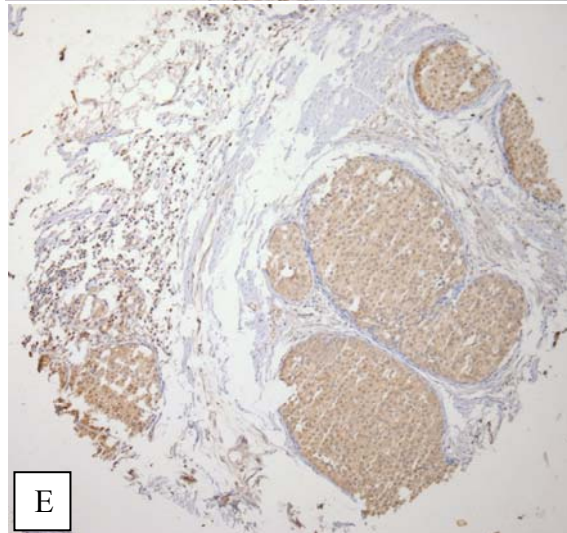
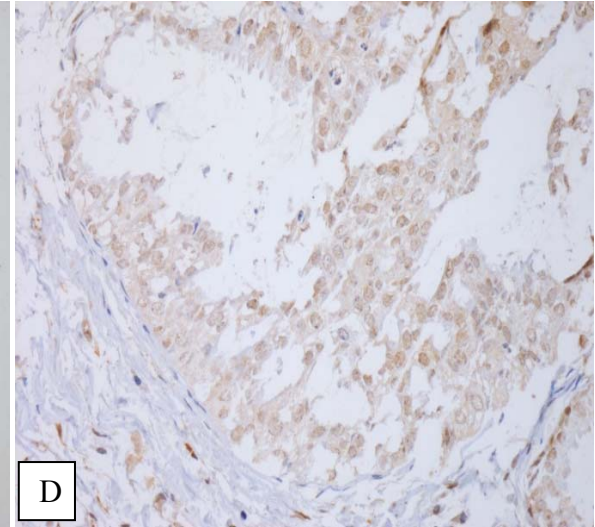
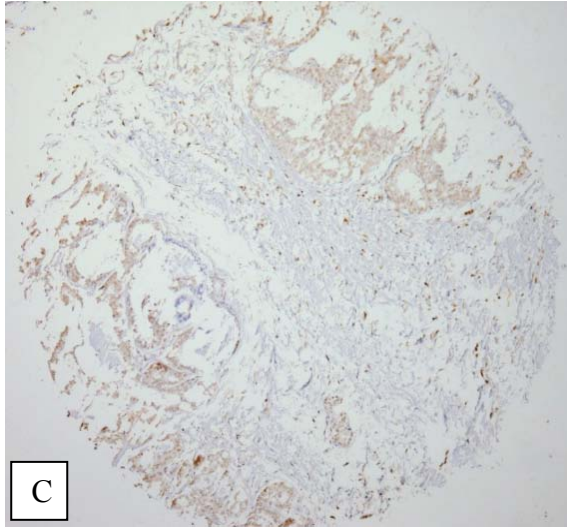
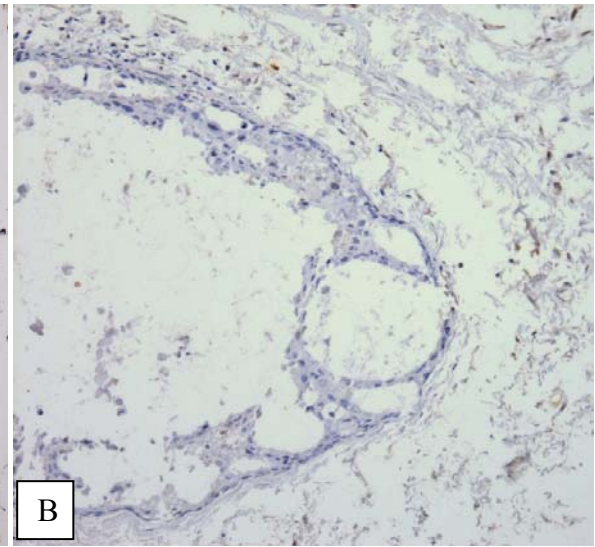
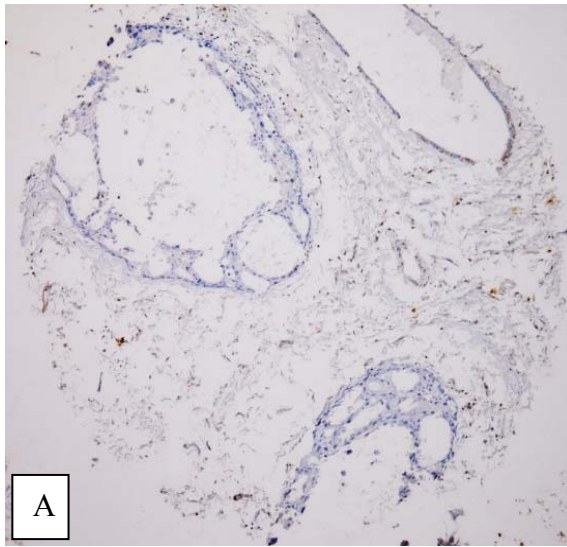


Figura 14 - Expressão proteica de GRB10 em células epiteliais do parênquima mamário normal. Imagens adquiridas do microscópio Olympus BX53 TF com Câmera Digital Q Color 5, 10.5 Mp Cad. A e B: Expressão citoplasmática de intensidade moderada e positividade de alguns núcleos. (Aumento de 100X e de 400X, respectivamente).

A intensidade de marcação imunoistoquímica de GRB10 nas células neoplásicas dos grupos de amostras CDIS e componente *in situ* CDIS/CDI variou de negativa a forte. Na Figura 15 observamos a expressão imunoistoquímica variável no grupo de lesões CDIS.



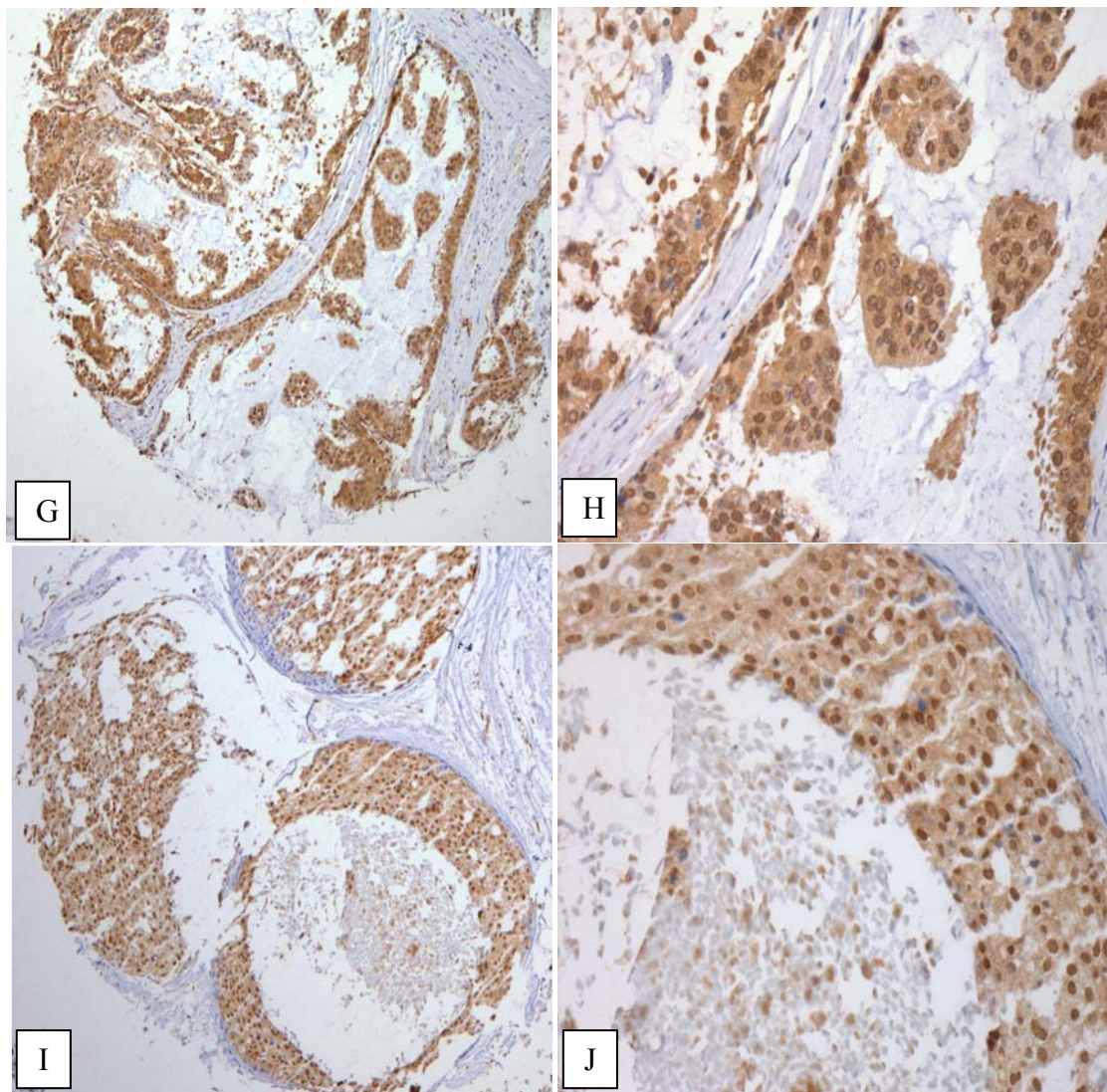


Figura 15 - Expressão proteica de GRB10 em CDIS (amostras do TMA1) negativa e positiva com localização citoplasmática e nuclear. Imagens adquiridas do microscópio Olympus BX53 TF com Câmera Digital Q Color 5, 10.5 Mp Cad. A e B (componente *in situ* do CDIS-CDI): Expressão imunohistoquímica negativa; C e D (componente *in situ* do CDIS - CDI): positivo com intensidade fraca no citoplasma e núcleo; E e F (CDIS puro): positivo com intensidade moderada citoplasmática com raros núcleos positivos; G e H (CDIS puro): positivo com intensidade de expressão forte citoplasmática e núcleos positivos. I e J (CDIS puro): positivo com intensidade moderada citoplasmática e forte nuclear. (Aumento de 100X e de 400X, em A, C, E, G e I; e em B, D, F, H e J, respectivamente). Abreviações: CDIS, carcinoma ductal *in situ*. CDIS-CDI, carcinoma ductal *in situ* associado a carcinoma ductal invasivo.

4.2.8 Avaliação de *GRB10* como marcador candidato a predição de invasão em CDIS

A proteína GRB10 que foi mais frequentemente positiva, em nível de expressão proteica, nas lesões CDIS puro do que no componente *in situ* do CDIS-CDI, foi novamente avaliada por IIQ em um grupo de amostras, inicialmente diagnosticadas como CDIS puro e que apresentaram ou não, um segundo evento, definido como recidiva local e/ou progressão para doença invasiva, e/ou metastática (critério definido no item 2.1.1), ao longo de pelo menos seis anos de seguimento.

Para uma avaliação preliminar do potencial deste candidato à predição de invasão em CDIS, foram selecionados 8 casos que apresentaram segundo evento e 20 casos sem segundo evento. As reações de IIQ foram analisadas em cortes histológicos inteiros do bloco de parafina contendo a neoplasia. Avaliamos apenas a expressão citoplasmática e a mesma categorização, que foi identificada como diferencialmente expressa entre CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI.

Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de amostras CDIS puro com ou sem segundo evento. Na Tabela 5 apresentamos os dados da associação entre a expressão imunohistoquímica citoplasmática de GRB10 categorizada como negativa [escores 0-4 e 5 (1+4)] e positiva [escores 6-7 e 5 (2+3)], conforme descrito no item 4.2.2.

Também foram realizadas avaliações da expressão imunohistoquímica citoplasmática de GRB10 em outras categorizações de escores (item 3.11.1), sendo que em nenhuma delas foram encontradas diferenças significativas.

Tabela 5 - Associação entre a expressão citoplasmática de GRB10 e os casos de CDIS puro sem segundo evento e com segundo evento.

	categorização 4 - GRB10 citoplasma (0-4 x 6-7); legenda: 0-4:0; 6-7:1; 5 (1+4)=0; 5 (2+3)=1		P
	0	1	
Segundo evento			
0	9 (45,0%)	11 (55,0%)	0,811
1	4 (50%)	4 (50%)	

Legenda: Segundo evento (0- sem segundo evento; 1- com segundo evento)

É importante mencionar, mais uma vez, que esta foi apenas uma avaliação preliminar desta proteína para este fim. Certamente, é necessário um aumento do número amostral para uma avaliação mais precisa do potencial deste marcador como preditor de invasão de CDIS.

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

Para investigar a expressão da proteína GRB10 ao longo da progressão do carcinoma ductal, este marcador (com diferença de expressão proteica entre CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI) foi também avaliado em dois TMAs (2 e 3), compostos por lesões CDI (item 3.7.1). Nesta análise, avaliamos apenas a marcação citoplasmática com a mesma categorização de escores que foi mencionada no item 4.2.2, considerando o número de casos com a expressão imunoistoquímica de GRB10 negativa e positiva nos três diferentes grupos de lesões (CDIS puro, componente *in situ* do CDIS-CDI e CDI).

No grupo de lesões CDI (TMAs 2 e 3) analisamos 250 casos avaliáveis, com 144 casos (57,6%) negativos para a expressão imunoistoquímica de GRB10 e 106 casos (42,4%) apresentando expressão citoplasmática positiva. Estes dados estão demonstrados no gráfico de barras da Figura 16.

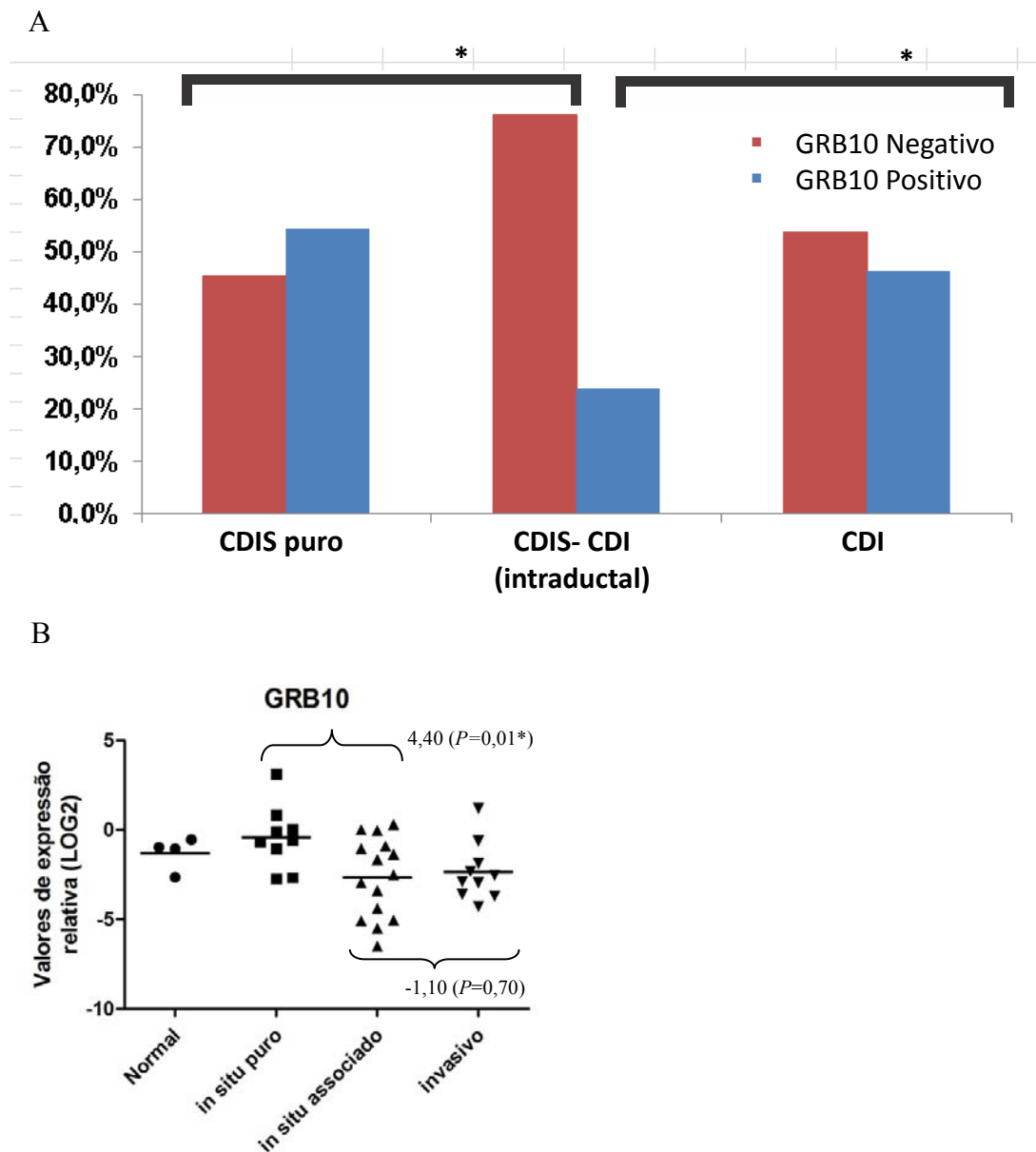


Figura 16 - Expressão de GRB10 ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama. (A), Gráficos de barras representando a frequência de amostras categorizadas na IIQ como negativas [0-4 e 5 (1+4)] e positivas [6-7 e 5 (2+3)] em CDIS puro, componente *in situ* do CDIS-CDI e CDI. (B), gráfico de expressão de RNAm, obtido pela análise de RT-qPCR. Ao lado dos colchetes { }, estão os valores de diferença de expressão (*fold change*). Abreviações: CDIS, carcinoma ductal *in situ*; CDIS-CDI, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo; CDI, carcinoma ductal invasivo. (*) $P < 0.05$.

No gráfico de expressão de RNAm observa-se uma redução da expressão entre o CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI, segundo os dados de RT-qPCR pelo sistema TLDA. Para o gene *GRB10* há correspondência entre a expressão de RNAm e a proteína entre CDIS puro e CDIS associado, sendo que a redução de

expressão da proteína entre o CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI foi estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($P=0,01$). Foi observado um aumento de expressão proteica do GRB10 entre CDIS associado e CDI.

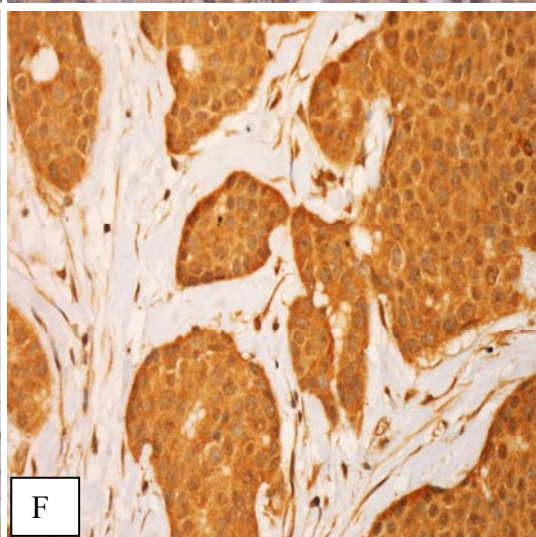
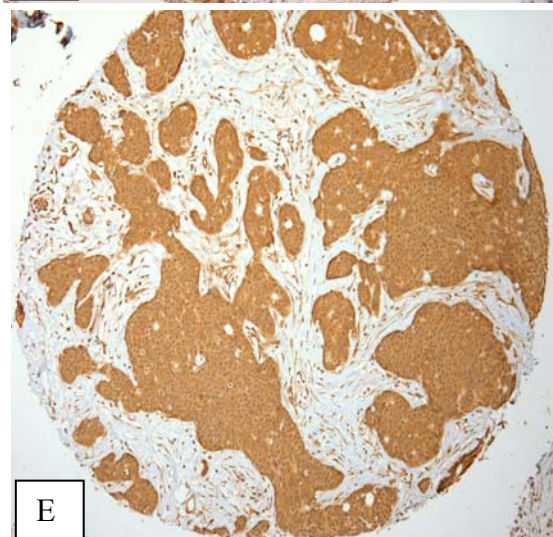
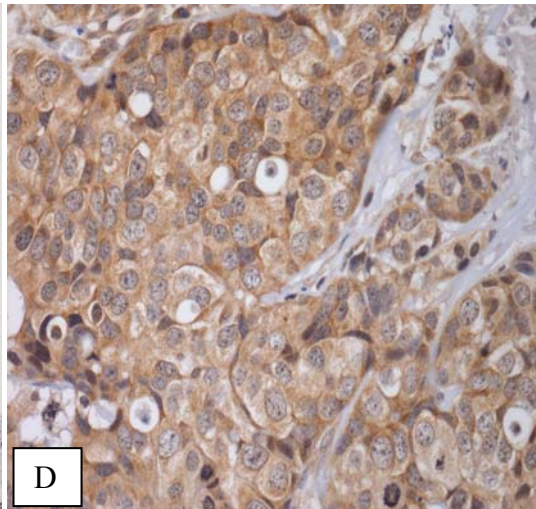
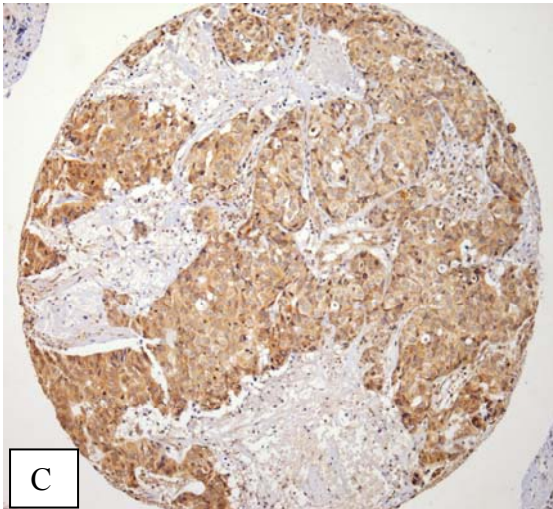
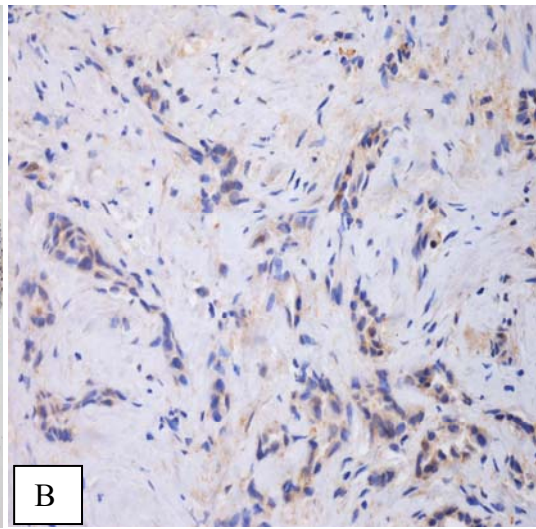
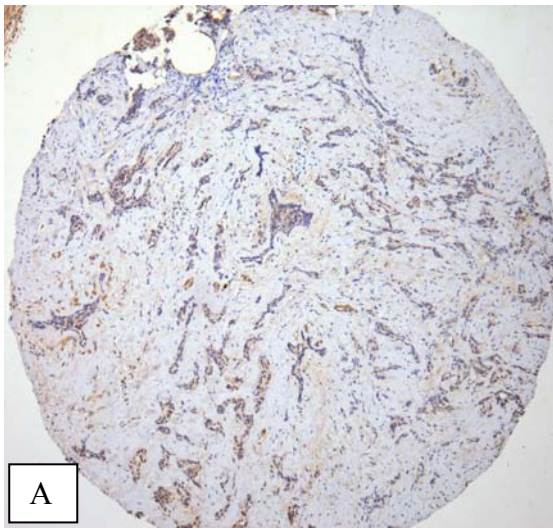
É importante ressaltar que, tanto em nível de RNAm como de proteína, foi observado um pico na diminuição de expressão em células do componente *in situ* de uma lesão invasiva, sendo que a modulação no nível de expressão dos outros grupos é menos acentuada.

Os gráficos de expressão dos 14 genes validados por RT-qPCR, ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama estão demonstrados no Anexo 10.

A frequência de amostras categorizadas por IIQ segundo foi descrito no item 4.2.2, em CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI das outras três proteínas avaliadas (MAPK8, INPP1 e EDN1), que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre estas duas lesões pré-invasivas, está representada em gráfico de barras no Anexo 12.

4.2.10 Demonstração fotográfica microscópica da localização e intensidade de expressão de GRB10 nos TMAs 2 e 3 (compostos por CDI)

A localização da marcação imunoistoquímica de GRB10 é citoplasmática e/ou nuclear, nas células do tecido tumoral, como já descrevemos no item 3.11.1 e Quadro 5, não sendo observada marcação de membrana citoplasmática. A intensidade de marcação imunoistoquímica de GRB10 nas células neoplásicas do grupo de amostras CDI variou de fraco a forte. Na Figura 17 observamos a expressão imunoistoquímica variável no CDI.



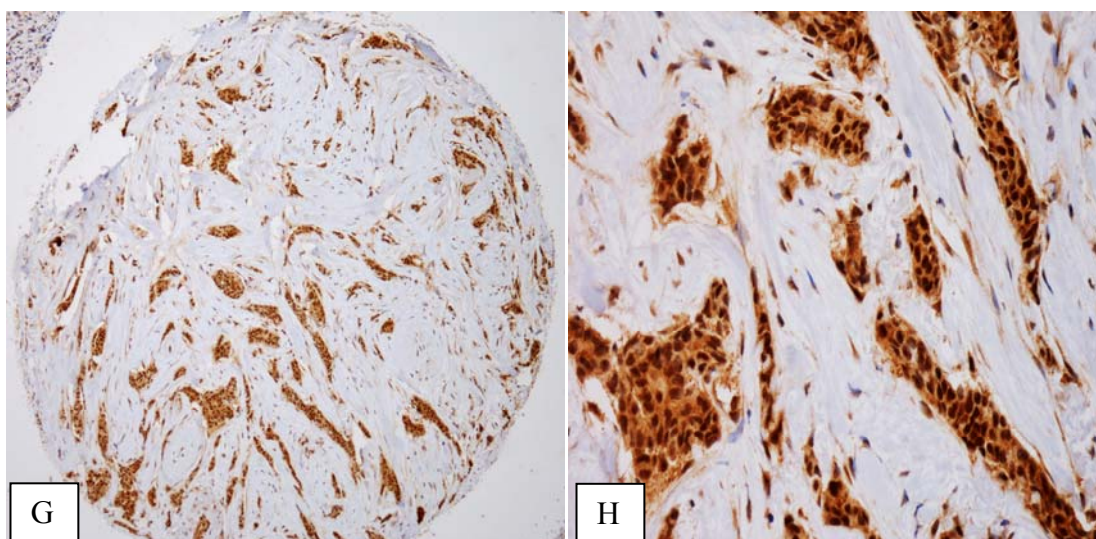


Figura 17 - Expressão proteica de GRB10 em CDI (amostras dos TMAs 2 e 3) de intensidade fraca a forte, com localização citoplasmática e nuclear. Imagens adquiridas do microscópio Olympus BX53 TF com Câmera Digital Q Color 5, 10.5 Mp Cad. A e B: Expressão imunoistoquímica citoplasmática fraca irregular; C e D: Expressão imunoistoquímica citoplasmática moderada; E e F: Expressão imunoistoquímica citoplasmática forte; G e H: Expressão imunoistoquímica citoplasmática e nuclear de intensidade forte. (Aumento de 100X e de 400X, respectivamente). Abreviações: CDI, carcinoma ductal invasivo.

4.2.11 Avaliação do potencial prognóstico de GRB10

O potencial prognóstico de GRB10 foi avaliado utilizando os TMAs 2 e 3, compostos por amostras CDI (item 3.7.1). Para esta análise, as amostras foram categorizadas como descrevemos no item 4.2.2. Analisamos a associação entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e as variáveis clinicopatológicas nos TMAs CDI (2 e 3).

Foram analisados 166 casos na associação entre a marcação imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e a expressão de RE. Observamos que a expressão imunoistoquímica citoplasmática positiva de GRB10 está presente em um maior número de casos com expressão negativa de RE (59,3%), com diferença estatística significativa ($P=0,028$).

Foram analisados 165 casos na associação entre a marcação imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e a expressão de Ki67. A expressão negativa de GRB10 associou-se com a menor expressão imunoistoquímica de Ki67 (< 15%), com p valor estatisticamente significativo ($P=0,037$).

Foram analisados 179 casos na associação entre a marcação imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e o grau histológico de SBR modificado

(item 1.2). A expressão negativa de GRB10 associou-se com o Grau 1 de SBR modificado, com p valor estatisticamente significativo ($P=0,009$).

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a marcação citoplasmática de GRB10 e as demais variáveis clínico-patológicas disponíveis para as amostras CDI analisadas. Todos os resultados desta associação podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6 - Associação entre a expressão imunohistoquímica citoplasmática de GRB10 e as características clinicopatológicas nos TMAs compostos por lesões CDI (2 e 3).

	categorização 4- GRB10 citoplasma- (0-4 x 6-7); legenda: 0-4:0; 6-7:1; 5 (1+4)=0; 5 (2+3)=1		<i>P</i> (* <i>P</i> <0.05 (**) <i>P</i> <0,01
	0	1	
RE			
negativo	22 (40,7%)	32 (59,3%)	0,028*
positivo	66 (58,9%)	46 (41,1%)	
RP			
negativo	40 (47,1%)	45 (52,9%)	0,083
positivo	41 (61,2%)	26 (38,8%)	
Status			
HER2			
negativo	78 (54,2%)	66 (45,8%)	0,660
positivo	17 (58,6%)	12 (41,4%)	
KI67			
≤ 15%	38 (65,5%)	20 (34,5%)	0,037*
>15%	52 (48,6%)	55 (51,4%)	
EGFR			
negativo	58 (59,8%)	39 (40,2%)	0,060
positivo	35 (45,5%)	42 (54,5%)	
CK5,6			
negativo	81 (53,3%)	71 (46,7%)	0,772
positivo	13 (56,5%)	10 (43,5%)	
Grau SBR			
1	24 (68,6%)	11 (31,4%)	0,009**
2	54 (58,1%)	39 (41,9%)	
3	19 (37,3%)	32 (62,7%)	
Idade			
<35	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0,216
36-50	29 (45,3%)	35 (54,7%)	
>50	66 (58,9%)	46 (41,1%)	
CDIS			
associado			
sim	24 (53,3%)	21 (46,7%)	0,790
não	53 (51,0%)	51 (49,0%)	
Nº de linfonodos positivos			
≤ 3	51 (53,7%)	44 (46,3%)	0,872
>3	33 (52,4%)	30 (47,6%)	
Estadio clínico			
I e II	35 (59,3%)	24 (40,7%)	0,310
III e IV	61 (51,3%)	58 (48,7%)	

Legenda: (*) *P*<0.05 e (**) *P*<0,01

Foram observadas associações com significância estatística entre a positividade de expressão imunoistoquímica de GRB10 e o *status* negativo do RE ($P=0,028$), a negatividade de GRB10 com o Ki67 $\leq 15\%$ ($P=0,037$) e a negatividade de GRB10 com o Grau histológico I de SBR modificado ($P=0,009$). Estes dados podem sugerir que a presença de GRB10 esteja associada a um prognóstico desfavorável no CDI.

Não foram observadas associações com significância estatística entre a expressão imunoistoquímica de GRB10 e o imunofenótipo molecular. Entretanto, a negatividade de GRB10 associou-se com um maior número de casos com imunofenótipo luminal A ($P=0,0986$). Os gráficos da associação entre a expressão proteica de GRB10 e o imunofenótipo molecular estão documentados em Anexo 14.

Na sequência, verificamos a associação entre a marcação citoplasmática de GRB10 e a sobrevida global e livre de doença em pacientes com CDI. O tempo de seguimento variou de um mês até 180 meses ($81,27 \pm 62,68$, média \pm desvio padrão). Um total de 118 óbitos e 120 recidivas foram observadas durante este período de acompanhamento. Não foram observadas associações com significância estatística, tanto para a sobrevida global, quanto para a sobrevida livre de doença ($P=0,73$ e $P=0,90$, respectivamente (Figura 18). Os gráficos das associações entre a expressão de GRB10, sobrevida global e livre de doença, com as características clinicopatológicas estão demonstrados em Anexo 15.

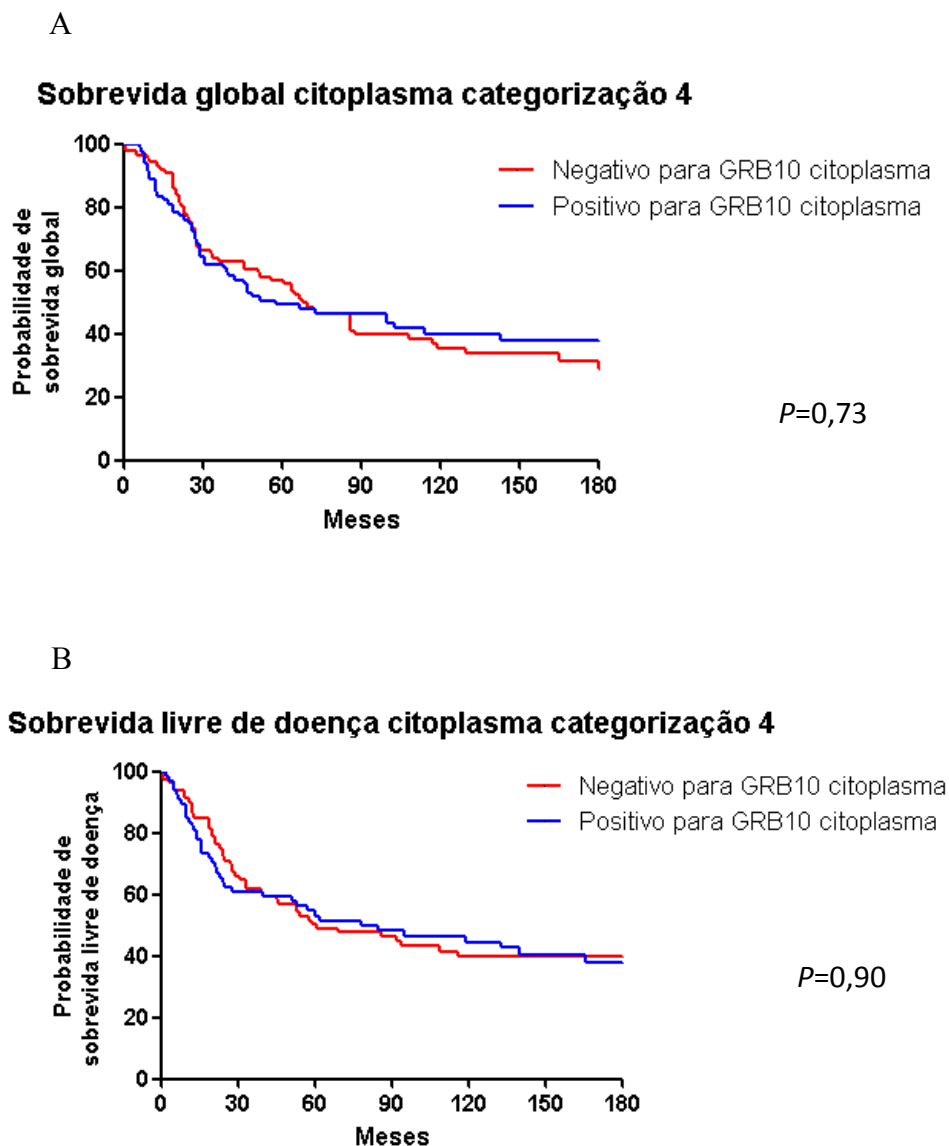


Figura 18 - Curvas de Kaplan-Meier para cálculo de sobrevida. (A), sobrevida global. (B), sobrevida livre de doença. No eixo X, são mostrados os meses de seguimento e no eixo y a probabilidade de sobrevida global e livre de doença. (Categorização 4, conforme descrito em materiais e métodos, item 3.11.1)

5 DISCUSSÃO

O carcinoma mamário é uma doença heterogênea, classificado em vários subtipos morfológicos, podendo apresentar dimensões, graus, potencial metastático e prognóstico variáveis. A escolha da melhor terapia para pacientes com câncer de mama é ainda definida, na maioria das vezes, pelas informações anátomo-patológicas contidas no exame diagnóstico de rotina, observadas em cortes histológicos do tecido tumoral. Neste exame o patologista deve fornecer informações importantes como a distinção entre uma neoplasia de baixo grau *versus* alto grau, a sua dimensão, a presença de invasão vascular e linfonodal, que definirão o comportamento biológico da neoplasia e a necessidade de terapia sistêmica. Porém, a maior compreensão das bases moleculares e celulares de iniciação e progressão do câncer tem fornecido ferramentas para refinarmos a classificação e os diferentes perfis das neoplasias mamárias, ampliando assim as possibilidades de tratamento.

O carcinoma ductal (NST) (item 1.2) pode manifestar-se na forma *in situ* (CDIS) e/ou invasiva (CDI). Vários estudos clínicos, patológicos e moleculares têm fornecido dados, que indicam o caráter precursor, mas não obrigatório, do CDIS para a forma invasiva. Embora vários critérios morfológicos do CDIS sejam estabelecidos para guiarem a melhor escolha terapêutica, como o tamanho da neoplasia, o grau, a presença de comedonecrose e o *status* das margens cirúrgicas, outras possibilidades de tratamento, determinadas a partir de novos testes moleculares e novas drogas alvo, poderão futuramente estar disponíveis para redução de risco de recorrência e progressão para o carcinoma invasivo (ELLIS et al. 2012).

Um estudo prévio do grupo de pesquisa, que utilizou cDNA *microarray* e microdissecção a *laser*, observou as diferenças moleculares entre duas lesões epiteliais morfológicamente similares [o CDIS puro e o componente *in situ* de uma lesão que coexiste com o carcinoma ductal invasivo (CDIS-CDI)], sugerindo que alterações moleculares ocorrem nas lesões pré-invasivas, antes do aparecimento das alterações morfológicas de invasão (CASTRO et al. 2008). A partir de uma plataforma customizada de genes (plataforma 2.3k) pertencentes às vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT, esse estudo prévio avaliou a expressão

gênica de amostras não neoplásicas, CDIS puro e CDIS-CDI, identificando uma assinatura de 57 genes diferencialmente expressos entre as células desses componentes, com características morfológicas semelhantes, cujo nível de expressão desses genes, em conjunto, foi capaz de discriminar corretamente o grupo de amostras (CASTRO 2008), salientando o potencial desses genes, de estarem envolvidos com o processo de progressão do CDIS. Neste trabalho, com o intuito de avaliarmos em detalhes, o comportamento desses genes durante a progressão do CD de mama, nós analisamos 28 candidatos individualmente, através de RT-qPCR e anticorpos comerciais para validação por IIQ. O sistema TaqMan é uma tecnologia de alta especificidade, capaz de avaliar com grande sensibilidade o nível de expressão transcricional de genes. O uso de ensaio TLDA nos permitiu avaliar um grande número de genes em um única reação.

A amplificação dos produtos de cDNA reversamente transcritos a partir de RNAm tem sido utilizada como uma ferramenta de rotina em biologia molecular para estudar expressão gênica. O PCR em tempo real é de fácil execução, proporciona a precisão necessária e produz resultados confiáveis, bem como de rápida quantificação. Este método fornece a quantificação relativa em tempo real de RT-PCR de um transcrito do gene alvo, em comparação com a transcrição de genes de referência, apresentando alta sensibilidade.

Entre os 20 genes avaliados neste estudo (Tabela 24), 14 apresentaram dados concordantes na casuística estudada.

Neste estudo, avaliamos um número de amostras independentes de tecido congelado, sendo 9 amostras de CDIS puro, 17 amostras de componente in situ de CDIS-CDI e 10 amostras de CDI (Quadro 3), com o objetivo de testarmos o potencial de marcador de predição de progressão do CD de mama. Nesta fase, precisamos de amostras CDIS congeladas para avaliarmos o nível de expressão gênica. O tecido congelado, não fixado, preserva a integridade do RNA, já que é um componente molecular muito vulnerável. Como o tamanho das amostras de CDIS congeladas é frequentemente pequeno, geralmente variando em torno de poucos milímetros, é importante implementar procedimentos de controle de qualidade, adaptados às quantidades de tecido (BOTLING e MICKE 2011).

O diagnóstico precoce do câncer mamário, que tem sido feito em lesões não palpáveis, cada vez mais diminutas, muitas delas associadas à microcalcificações identificadas apenas através dos exames de imagem, dificulta a seleção macroscópica adequada de área representativa de neoplasia *in situ* na peça cirúrgica a fresco, importante para o congelamento e estoque da amostra em banco de tecidos, posterior isolamento e preparo do RNAm, para a investigação de expressão de genes. A limitação em obtermos uma maior casuística com amostras congeladas de CDIS é um fator que dificulta a seleção de amostras em diferentes graus histológicos, independentes e/ou pareadas (CDIS-CDI), nas etapas de validação. Para testar o potencial de predição de progressão de doença em CDIS, desses genes diferentemente expressos, o nosso grupo de pesquisa tem se esforçado para a obtenção de amostras congeladas de CDIS. Temos nos empenhado junto aos profissionais das várias disciplinas, em estabelecermos um protocolo de rotina de obtenção de amostras congeladas de lesões mamárias, a partir de produto de biópsias, após o consentimento informado das pacientes. Este protocolo, quando aprovado, nos possibilitará estocar um número maior de lesões CDIS em banco de tecidos, puro e associado à invasão, de forma que possamos estabelecer casuísticas maiores de lesões congeladas, em grupos mais homogêneos entre si, considerando o grau histológico, os subtipos e a expressão de marcadores prognósticos, com longo período de acompanhamento para verificarmos a progressão, ou um segundo evento. As 9 amostras congeladas que obtivemos para comporem a nossa casuística de CDIS puro são de alto grau histológico (grau nuclear 3). Isto demonstra a maior dificuldade em obtermos amostras de CDIS de baixo grau. Estes tumores tendem a não se apresentarem como massas palpáveis ou visíveis a olho nu, portanto, mais difíceis de serem selecionadas na peça a fresco. Quando adotarmos o protocolo de coleta de tecidos no momento da realização da biópsia diagnóstica, teremos uma maior chance de estocarmos lesões CDIS precoces e de baixo grau histológico. Poderemos então, definir uma casuística em grupos de lesões previamente selecionadas. Um estudo com casuística maior e seleção de casos, em grupos com classificações homogêneas, poderá ser realizado no futuro.

Embora avanços tenham sido dados na obtenção de RNA amplificado a partir de tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (FFEP), através de

protocolos específicos para o isolamento do RNA e posterior análise transcricional, demonstrados em alguns artigos na literatura, incluindo o nosso grupo (SARAIVA et al. 2006; MÜLLER et al. 2011), a baixa qualidade do RNA obtido, pode introduzir vieses na análise de expressão gênica, quando as diferenças no nível de expressão não são tão grandes, situações comuns em estudos que buscam marcadores moleculares de progressão. Os vieses são mais comuns em amostras FFEP de arquivos armazenados por longos períodos, que são justamente as melhores amostras para se testar o potencial de marcador molecular de predição de algum evento. Assim, para trabalhos como este, ainda, o melhor material para esta investigação, seriam as amostras congeladas.

Interessantemente, nossos resultados atuais confirmaram o que nós observamos anteriormente por microarray (CASTRO et al. 2008) e que foram confirmados por RT-qPCR (SENS-ABUÁZAR et al. 2012), que a progressão de CDIS é marcada por uma diminuição de expressão de genes. Neste estudo atual, nós confirmamos a diminuição de expressão de 13 dos 14 genes avaliados. Isto sugere que mecanismos de regulação gênica, como metilação de promotor, pode desempenhar uma papel importante na invasão de tecidos adjacentes.

Dentre os 14 genes identificados como diferentemente expressos, 4 (*GRB10*, *MAPK8*, *INPP1*, *EDNI*) foram os mais fortes candidatos a estarem envolvidos com a progressão do CDIS.

A seguir, apresentamos uma breve descrição sobre cada um dos 4 genes selecionados para o estudo com IIQ.

O gene *MAPK8* humano (*mitogen-activated protein kinase 8*), também conhecido como *JNK*, *JNK1*, *PRKM8*, *SAPK1*, *JNK-46*, *JNK1A2*, *SAPK1c*, *JNK21B1/2*, está localizado no braço longo do cromossomo 10. A proteína codificada por este gene é um membro da família MAP quinase. As MAP quinases agem como um ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, tais como regulação da proliferação, transcrição, diferenciação e desenvolvimento. Esta quinase é ativada por estímulos celulares diferentes. A ativação da quinase pelo fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa) é necessária para induzir a apoptose. Quatro variantes de transcritos que codificam as isoformas distintas de *splicing* alternativo têm sido

relatadas (Genome BioInformatics Research Lab). Estudos demonstraram que *GRB10* atua como um ligante direto na regulação do sinal da *MAPK* mitogênica, em cultura de fibroblastos, aumentando os níveis de proliferação celular (DENG et al. 2008).

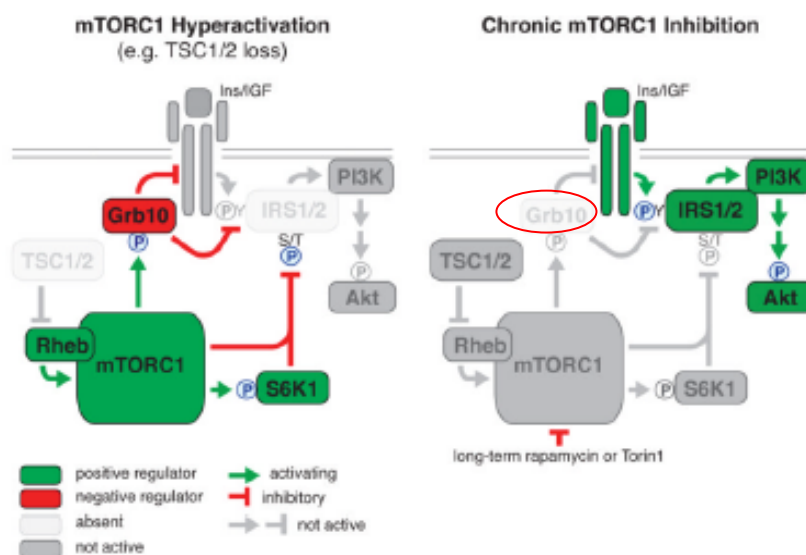
O gene *INPP1* (*inositol polyphosphate-1-phosphatase*) está localizado no braço longo do cromossomo 2. É um fator de transcrição regulador de sítios de ligação, que codifica a enzima inositol polifosfato-1-fosfatase, uma das enzimas envolvidas em vias de sinalização fosfatidilinositol e metabolismo. A enzima remove o grupo fosfato na posição 1 do anel de inositol, a partir de polifosfatos de inositol 1,4-bifosfato e inositol 1,3,4-trisphosphate. Há poucos estudos com *INPP1* e câncer humano. Um deles demonstrou a superexpressão deste gene em câncer colorretal (LI et al. 2000).

O gene *EDN1* (*endothelin 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 6 e codifica uma proteína capaz de secretar o peptídeo endotelin 1, um potente vasoconstrictor produzido por células endoteliais vasculares. O *endothelin*, que tem um papel crucial na diferenciação celular, proliferação e processos de migração, constitui uma família de pequenos aminoácidos peptídeos vasoativos. O *EDN1* tem sido estudado em câncer de mama, sendo demonstrados efeitos de crescimento tumoral e neo-angiogênese, atuando em células epiteliais e estromais adjacentes. (The Human Protein Atlas 2012b). Nós observamos a expressão freqüente da proteína EDN1 nas células neoplásicas do carcinoma mamário e nas células endoteliais do parênquima mamário normal e tumoral, representados nos TMAs deste estudo, analisados por IIQ.

O gene *GRB10* humano (*growth factor receptor-bound protein 10*), também conhecido como *RSS*, *IRBP*, *MEG1*, *GRB-IR* e *Grb10*, está localizado no braço curto do cromossomo 7, com 190 kb de DNA genômico e consiste em pelo menos 22 éxons. A proteína codificada por este gene é membro de uma superfamília de pequenas proteínas multi-modulares adaptadoras, que incluem GRB7 e GRB14 e interagem com receptores tirosina-quinase e moléculas de sinalização (LIM et al. 2004). Este gene codifica uma proteína de ligação de receptor de factor de crescimento, que interage com os receptores de insulina e insulina-like *growth factor*-receptores. Diferentes isoformas de transcritos de *splicing* alternativo foram

identificadas. A sobre-expressão de algumas isoformas da proteína codificada inibe a atividade quinase de tirosina e resulta em supressão do crescimento. Estudos em animais com o gene *knockout* demonstraram que *GRB10* atua como um inibidor de vias de sinalização intracelular que regulam o crescimento e o metabolismo (HOLT e SIDDLE 2005). *GRB10* interage com o receptor Kit/fator *stem cell*, tirosina-quinase, que tem um papel reconhecido na migração celular. Estudos mais recentes constataram que *GRB10* interfere com a ligação de proteínas WNT na superfície celular, indicando um possível mecanismo molecular, onde a superexpressão de *GRB10* suprime a sinalização WNT, sugerindo ser um regulador negativo da via de sinalização WNT (TEZUKA et al. 2007).

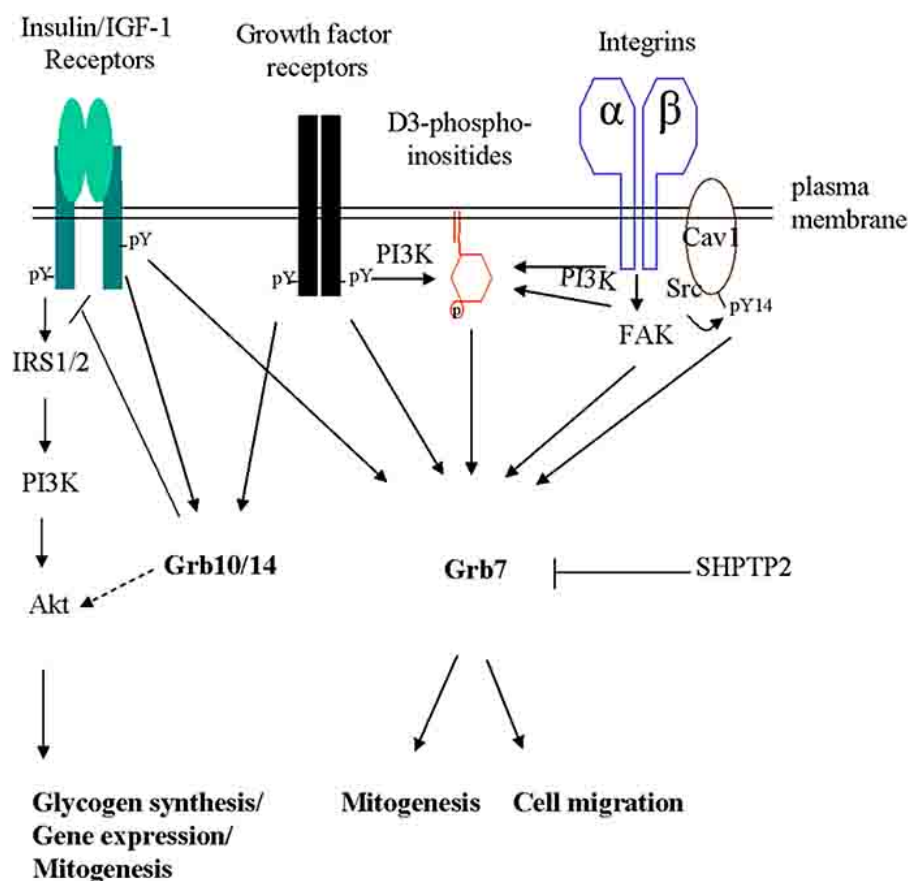
A proteína adaptadora *GRB10* foi também identificada recentemente como um substrato a jusante de *mTORC1*, que media a inibição da sinalização PI3K-AKT, com um papel de supressão de tumor e um regulador negativo de *mTORC1*, inibindo a sinalização de fatores de crescimento (HSU et al. 2011). *mTORC1* orquestra a inibição da sinalização de PI3K-AKT, ativando e estabilizando *GRB10*, enquanto inibe e desestabiliza as proteínas IRS (receptores de insulina). Podemos observar este *feedback* entre *mTORC1* e *GRB10* na Figura 19.



Fonte: HSU et al. (2011)

Figura 19 - Esquema que demonstra o *feedback* negativo de *GRB10*, inibindo os receptores de insulina e a sinalização de PI3K-AKT.

Na Figura 20 observamos os sinais de transdução mediados por GRB7, da família de proteínas adaptadoras. Elas são proteínas citosólicas, que recebem sinais da superfície celular para participarem de várias cascatas de sinalização intracelular, atuando como reguladores positivos ou negativos de diferentes receptores e regulam várias funções celulares, como migração, mitogênese e expressão de genes. *GRB10* e *GRB14* podem inibir os receptores de insulina, que ativam PI3K-AKT.



Fonte: SHEN e GUAN (2004).

Figura 20 - GRB10 e GRB14 inibindo os receptores de insulina, que ativam PI3K-AKT.

Com o intuito de avaliarmos o potencial desses 4 genes, de serem introduzidos na rotina clínica, analisamos as proteínas codificadas por eles, através do método imunistoquímico, que é uma ferramenta complementar amplamente utilizada e reconhecida na investigação de marcadores biológicos diagnósticos e prognósticos, podendo identificar neoplasias com potencial de predição de progressão e de pior evolução.

Os quatro candidatos foram então avaliados por IIQ em um TMA composto por lesões *in situ* puro e componente *in situ* do CDIS-CDI. Mesmo considerando que a IIQ talvez não seja a melhor ferramenta para análises quantitativas, como propomos neste estudo, já que implica em certo grau de subjetividade em sua interpretação. Além disso, o nível de proteína, não necessariamente corresponde ao nível de expressão de RNAm, uma vez que vários mecanismos pós-transcricionais estão envolvidos no nível de expressão proteica. Todos os genes candidatos apresentam expressão proteica citoplasmática e nuclear. Embora, os 3 genes *MAPK8*, *INPP1* e *EDNI* sejam diferencialmente expressos entre os dois grupos de lesões (CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI), como demonstrou CASTRO et al. (2008), podemos assim, discutir o fato de não encontrarmos associações estatisticamente significativas para *MAPK8*, *INPP1* e *EDNI*, quando estudados por IIQ.

Apenas *GRB10* foi validado pelo método IIQ, com expressão proteica citoplasmática maior no grupo de lesão CDIS puro, sendo este resultado concordante com os dados de RNAm.

Alguns fatores podem ter contribuído para a ausência de associação entre a expressão de RNAm e das proteínas codificadas por estes outros três genes através de IIQ.

No presente estudo, trabalhamos com proteínas codificadas pouco conhecidas e não utilizadas na rotina diagnóstica e clínica. Como a maioria destes anticorpos é pouco estudada pelo método IIQ em câncer de mama, nós escolhemos os policlonais, que são menos específicos, já que ainda não se conhece o seu epítipo de interesse. A maior compreensão sobre a estrutura da proteína codificada pelo gene *GRB10* e suas interações químicas (Anexo 13), poderão contribuir para a escolha de anticorpos mais específicos para a avaliação de sua expressão em cortes de tecido.

Além disso, os diferentes anticorpos disponíveis comercialmente podem eventualmente, oferecer diferentes resultados de expressão proteica, por apresentarem diferenças em suas especificidades e sensibilidades. Torna-se necessária uma maior investigação, com a avaliação de diferentes clones, para cada uma das proteínas estudadas. A subjetividade de interpretação pelo método IIQ semiquantitativo é também discutida na literatura.

Embora artigos científicos tenham validado a utilização de TMAs para estudos de pesquisa, a heterogeneidade intratumoral dos carcinomas mamários pode ser um fator limitante para a interpretação da expressão das proteínas ainda pouco conhecidas pelo método IIQ, quando avaliamos uma pequena área tumoral.

Uma outra forma de analisar a concordância entre RNAm e proteína seria o método *Western blotting* (WB). Trata-se de um método molecular e bioquímico com alto poder quantitativo, considerado padrão ouro para detectar e quantificar proteína em tecido biológico, apresentando altas sensibilidade e especificidade. No entanto, a extração de proteínas com bom estado de preservação a partir de amostras congeladas dos diferentes grupos de lesões investigadas em nosso estudo, não é trivial, sendo a quantidade de cada amostra um fator limitante para o emprego desta técnica. Adicionalmente, o seu emprego em amostras FFEP usadas para a etapa de avaliação do potencial de marcador de predição de progressão do CDIS neste estudo, seria ainda mais prejudicada, uma vez que a purificação de proteínas com alto estado de preservação é extremamente complexo.

A expressão da proteína codificada pelo gene *GRB10* foi observada em nosso estudo, nas células epiteliais neoplásicas e no componente normal, estando localizada no citoplasma e/ou no núcleo. Há raros artigos na literatura que mencionam o estudo IIQ com o anticorpo GRB10. O *site* The Human Protein Atlas (2012b) demonstra alguns poucos exemplos de casos de carcinoma mamário estudados com IIQ e TMA. Assim como nós observamos em nosso trabalho, há a descrição da localização citoplasmática e/ou nuclear da expressão da proteína, tanto em células neoplásicas epiteliais, como em células ductais normais. Há também a demonstração de expressão nuclear da proteína com método de imunofluorescência em linhagens celulares. Não há dados na literatura sobre o significado da expressão nuclear da proteína GRB10. Um estudo menciona a funcionalidade da expressão da proteína

GRB7 no citoplasma de células de carcinoma mamário, que pertence à mesma família de proteínas adaptadoras. Esta localização da expressão proteica associou-se com menor sobrevida (NADLER et al. 2010). Poucos estudos sobre o gene *GRB10* e câncer de mama são relatados na literatura, como descrevemos acima. O *site* The Human Protein Atlas (2012b) demonstra a expressão de *GRB10* em linhagens celulares, em tecido mamário normal, incluindo células epiteliais ductais e mioepiteliais e no tecido neoplásico. Todas as imagens dos tecidos corados por imunistoquímica, demonstradas neste *site*, foram visualizadas em um *software* e anotadas manualmente por um patologista certificado. Foram usados critérios para a classificação do resultado imunistoquímico. Os parâmetros básicos de anotação incluíram uma avaliação que contém: i) a intensidade da coloração (negativo, fraco, moderado ou forte), ii) fração de células coradas (raro, <25%, 25-75% ou > 75%) e iii) localização subcelular (nuclear e / ou citoplasmático / membranosa) (PONTÉN et al. 2008). Segundo dados demonstrados no *site*, a expressão proteica mais freqüente do GRB10 é citoplasmática, de moderada intensidade e nuclear em poucos casos. Em nosso estudo, observamos a expressão nuclear em CDIS, em diferentes intensidades e frequências, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de lesões.

A expressão nuclear das proteínas foi também observada para os quatro anticorpos estudados, porém em menor frequência para EDN1, não sendo observadas associações estatisticamente significativas para nenhuma das quatro proteínas.

Além da via da insulina, o gene *GRB10* interage com as vias do *EGFR1*, que por sua vez, interage com outras vias tirosina-quinase, ativando fatores de transcrição no núcleo (AJIRO et al. 2010). Não se conhece o significado da expressão nuclear imunistoquímica da proteína GRB10. Podemos discutir a possibilidade de *GRB10* acumular no citoplasma, permitindo a sua translocação para o núcleo e a liberação de fatores de transcrição, à semelhança do que se observa na via canônica da β -catenina. Entretanto, tal evento não é descrito na literatura.

Os receptores que são reconhecidos pela família GRB7/10/14, compartilham a capacidade de ativar o sinal quinase mitogênico da via de transdução MAP. Estudos demonstraram que dois membros desta via, o *RAF1* e o *MEK1*, podem interagir com o domínio SH2 da proteína adaptadora GRB10. Em algumas células de

cultura, a ligação com *RAF1* é constitutiva, enquanto que a interação de *GRB10* com *MEK1* é insulino-dependente. Os autores observaram mutações que afetam a especificidade do domínio SH2 de *GRB10*. A sobre-expressão destes mutantes mostrou indução da apoptose em células em cultura (NANTEL et al. 1998; SCHARF et al. 2004; HE W et al. 1998). Outros estudos com linhagens celulares de câncer de mama sugeriram que a inibição da fosforilação de isoformas de GRB10 por inibidores de *PI3K* e *MAPK*, seja um alvo potencial nessas vias (DONG et al. 1997). A superexpressão de algumas isoformas da proteína codificada inibe a atividade tirosina-quinase e resulta em supressão do crescimento tumoral (Novus Biologicals 2004). Autores sugerem que a interrupção do complexo *RAF1-GRB10* pode contribuir na elaboração de estratégias terapêuticas contra os mecanismos da tumorigênese (KEBACHE et al. 2007).

O gene *GRB10* liga-se também a *ERBB2* e pode estar envolvido em vias de sinalização celular que promovem a formação de metástases e de respostas inflamatórias. Todas as três proteínas da família (*GRB7*, *GRB10* e *GRB14*) foram encontradas superexpressas em determinados tipos de câncer e em linhagens de células neoplásicas. Em particular, o *GRB7* (juntamente com o receptor de tirosina-quinase *erbB2*) está superexpresso em 20% a 30% dos tumores da mama. Também o *GRB7* liga-se a *ERBB2* e pode estar envolvido em vias de sinalização celular que promovem a formação de metástases e respostas inflamatórias. Há estudo prévio que relatou a estrutura do complexo de peptídeo Grb7-SH2/*erbB2* (IVANCIC et al. 2005).

A proteína quinase m-TOR é um promotor do crescimento celular que é desregulado no câncer. Apesar dos diversos processos controlados por m-TOR, poucos são os substratos alvo conhecidos desta serina-treonina quinase. Como já mencionamos previamente, o *GRB10* regula negativamente a sinalização do fator de crescimento. Especula-se que o *GRB10* possa funcionar a jusante da mTORC1, inibindo a sinalização da PI3K-Akt (HSU et al. 2011).

Portanto, parece que *GRB10* pode agir como um inibidor ou um ativador de transdução de sinal, na dependência de suas interações com as vias de sinalização.

Não há estudos na literatura sobre a atividade do gene *GRB10* no CDIS da mama.

Foi então realizada uma avaliação preliminar do potencial de GRB10 em prever invasão em CDIS, avaliando, por IHC, o corte inteiro de amostras CDIS 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. Não foram encontrados resultados com significância estatística.

É importante mencionar que nosso estudo utilizou uma casuística pequena de amostras CDIS puro com e sem segundo evento, que estava disponível no momento da realização desta etapa. Futuras investigações com casuísticas maiores são necessárias para a melhor compreensão do papel de GRB10 na predição de invasão de CDIS.

A expressão IHC do marcador foi então avaliada ao longo da progressão do CD. *GRB10* apresenta expressão aumentada nos estágios mais iniciais da progressão, quando as células ainda exibem um fenótipo pré-invasivo. Uma redução significativa foi observada no componente *in situ* que coexiste com invasão, com elevação da expressão da proteína ao longo da progressão, no CDI. Este resultado enfatiza o papel deste gene nos estágios iniciais da progressão, quando o CDIS é puro. Observamos diferenças de expressão da proteína em estágios precoces da progressão para GRB10, com redução significativa observada no componente CDIS-CDI, acompanhando a expressão de RNAm. A expressão negativa da proteína no CDIS associou-se estatisticamente com a presença de invasão ($P=0,01$).

A ausência de expressão proteica citoplasmática de GRB10 associou-se significativamente com características de melhor prognóstico no CDI, como Ki67 $\leq 15\%$ ($P=0,037$) e Grau histológico I de SBR modificado ($P=0,009$). A expressão positiva de GRB10 associou-se com RE negativo ($P=0,028$).

Na sequência, foi investigada a associação da expressão citoplasmática deste marcador com a probabilidade de sobrevida global e livre de doença em CDI. Os resultados observados com significância estatística, quando associamos a expressão citoplasmática de GRB10 e o comprometimento linfonodal (em Anexo 15), demonstram que este marcador não é independente, prevalecendo o marcador prognóstico de metástase linfonodal, já reconhecido na prática clínica.

Os resultados deste estudo sugerem que a investigação das diferenças moleculares entre células epiteliais de CDIS puro e do componente *in situ* do CDIS-

CDI, 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 nas etapas iniciais da progressão do CDIS. Um maior conhecimento do gene e da expressão de sua proteína codificada, além de uma investigação mais profunda do papel funcional de GRB10 no câncer de mama, poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas etapas precoces da carcinogênese.

Assim, a validação de GRB10 como marcador molecular pode ser testada no futuro através de novas abordagens. Os dados observados neste estudo, demonstrando diferença pontual entre os dois grupos de lesões pré-invasivas, sinaliza que este gene possa ser um marcador somente nos primeiros estágios da invasão. Além disso, os resultados de associação entre a ausência de expressão imunohistoquímica citoplasmática de GRB10 com fatores de prognóstico favorável, de certa forma surpreendentes, sugerem que este gene tenha um papel pontual na programação molecular das células epiteliais tumorais, ainda no ducto, que estão se preparando para invadir os tecidos adjacentes. Desta forma, este gene poderá ser investigado com maior profundidade em futuros trabalhos.

6 CONCLUSÃO

1. Esse trabalho confirmou a diferença de expressão em células epiteliais do CDIS puro e do componente *in situ* do CDIS-CDI em 70% (14 de 20) dos genes avaliados, sendo que destes, 93% (13) apresentaram maior expressão em CDIS puro, reforçando a observação de que a programação molecular dos primeiros estágios de transição de carcinoma *in situ* para invasivo é marcada predominantemente por redução da expressão gênica. *GRB10*, *EDN1*, *MAPK8* e *INPP1* apresentaram maior expressão com significância estatística, em células epiteliais do CDIS puro, quando comparadas com células do componente *in situ* de CDIS-CDI, indicando que a redução da expressão transcricional de *GRB10* pode ter um papel importante na aquisição do fenótipo invasivo.
2. A expressão imunohistoquímica citoplasmática de GRB10 apresentou maior frequência de positividade da marcação em lesões CDIS puro, confirmando os dados obtidos na análise de RNAm em um grupo completamente independente de amostras.
3. A proteína codificada pelo gene *GRB10* não apresentou resultado estatístico significativo para avaliação de seu potencial de predição de invasão em amostras CDIS puro com ou sem segundo evento.
4. Na avaliação do potencial prognóstico dessa proteína em lesões invasivas, a ausência de GRB10 associou-se com características clínico-patológicas de melhor prognóstico. A presença ou ausência da proteína não se associou com um aumento da probabilidade de sobrevida global e livre de doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **EMBO J** 1997; 16:3797-804.

Abuázar 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].

Ackland ML, Newgreen Df, Fridman M, et al. Epidermal growth factor induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. **Lab Invest** 2003; 8:435-48.

Agilent Technologies. **2100 Bioanalyzer Instrument. Genomics. RNA quality.** <URL:<http://www.agilent.com>>. [2012 nov 11].

Ajiro M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y. Critical involvement of RQCD1 in the EGFR-Akt pathway in mammary carcinogenesis. **Int J Oncol** 2010; 37:1085-93.

Allred DC, Anderson SJ, Paik S, et al. Adjuvant tamoxifen reduces subsequent breast cancer in women with estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ: a study based on NSABP protocol B-24. **J Clin Oncol** 2012; 30:1268-73.

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.

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene** 2005; 24:7455-64.

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.

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.

Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Mod Pathol** 2011; 24:157-67.

Baptist Medical Center South. **Gene expression and molecular subtypes in breast cancer**. 2011. Available from: <URL:<http://citinesun.com/blog/2011/04/25/gene-expression-and-molecular-subtypes-in-breast-cancer/>> [2013 jan 07].

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.

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.

Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial mesenchymal transitions. **Biochem Pharmacol** 2000; 60:1091-9.

Botling J, Micke P. Fresh frozen tissue: RNA extraction and quality control. **Methods Mol Biol** 2011; 675:405-13.

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

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One** 2013; 8:e57581.

Castro NP. **Análise do perfil de expressão gênica de carcinoma ductal in situ e invasivo em tumores de mama através da técnica de microarray**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Castro NP, Osório 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 HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol** 2004; 2:E7.

Cheang MCU, Chia AK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast Cancer. **JNCI J Natl Cancer Inst** 2009; 101:736-50.

Chiappetta G, Ferraro A, Botti G, et al. FRA-1 protein overexpression is a feature of hyperplastic and neoplastic breast disorders. **BMC Cancer** 2007; 7:17.

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

Cleator S, Ashworth A. Molecular profiling of breast cancer: clinical implications. **Br J Cancer** 2004; 90:1120-4.

Colditz G, Chia KS. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features. In: Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4). p.14-31.

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.

Costantino JP, Gail MH, Pee D, et al. Validation studies for models projecting the risk of invasive and total breast cancer incidence. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1541-8.

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.

Daly RJ. The Grb7 family of signalling proteins. **Cell Sign** 1998; 10:613-8.

Deng Y, Zhang M, Riedel H. Mitogenic roles of Gab1 and Grb10 as direct cellular partners in the regulation of MAP kinase signaling. **J Cell Biochem** 2008; 105:1172-82.

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.

Di Paola R, Ciociola E, Boonyasrisawat W, et al. Association of hGrb10 genetic variations with type 2 diabetes in caucasian subjects. **Diabetes Care** 2006; 29:1181-3.

Dong LQ, Du H, Porter SG, et al. Cloning, chromosome localization, expression, and characterization of an Src homology 2 and Pleckstrin homology domain-containing insulin receptor binding protein hGrb10g*. **J Biol Chem** 1997; 272:29104-12.

Dong LQ, Porter S, Hu D, Liu F. Inhibition of hGrb10 binding to the insulin receptor by functional domain-mediated oligomerization. **J Biol Chem** 1998; 273:17720-5.

Eisenberg ALM, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais. **Rev Bras Cancerol** 2001; 47:377-88.

Ellis IO, Collins L, Ichihara S, MacGrogan G. Invasive carcinoma of no special type. In: Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4). p.34-8.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1991; 19:403-10.

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.

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

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

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

Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K et al. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. **J Biol Chem** 2001; 276:17479-83.

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

Genome BioInformatics Research Lab. **Gene ID homepage**. Available from: <URL:<http://genome.crg.es/software/geneid/>> [2013 fev 02].

Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA, Smith RJ. Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. **J Biol Chem** 2003; 278:31564-73.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. **Cancer Res** 2003; 63:2172-8.

Hah N, Danko CG, Core L et al. A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. **Cell** 2011; 145:622-34.

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.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hansen H, Svensson U, Zhu J et al. Interaction between the Grb10 SH2 domain and the insulin receptor carboxyl terminus. **J Biol Chem** 1996; 271:8882-6.

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.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. **J Clin Oncol** 1999; 17(5):1474-1481.

He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science** 1998; 281:1509-12.

He W, Rose DW, Olefsky JM, Gustafson TA. Grb10 interacts differentially with the insulin receptor, insulin-like growth factor I receptor, and epidermal growth factor receptor via the Grb10 Src homology 2 (SH2) domain and a second novel domain located between the pleckstrin homology and SH2 domains. **J Biol Chem** 1998; 273:6860-7.

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

Holt LJ, Siddle K. Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action – and more? **Biochem J** 2005; 388(Pt 2):393-406.

Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics** 2006; 7:96.

Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. **Science** 2011; 332:1317-22.

Ivancic M, Spuches AM, Guth EC, Daugherty MA, Wilcox DE, Lyons BA. Backbone nuclear relaxation characteristics and calorimetric investigation of the human Grb7-SH2/erbB2 peptide complex. **Protein Sci** 2005; 14:1556-69.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

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

Jordan JJ, Inga A, Conway K, et al. Altered- function p53 missense mutations identified in breast cancers can have subtle effects on transactivation. **Mol Cancer Res** 2010; 8:701-16.

Kebache S, Ash J, Annis MG, et al. Grb10 and active Raf-1 kinase promote Bad-dependent cell survival. **J Biol Chem** 2007; 282:21873-83.

Kim D, Kim S, Koh H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J** 2001; 15:1953-62.

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.

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.

Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. **WHO Classification of tumours of the breast.** 4th ed. Lyon: IARC; 2012. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4). WHO Classification of Tumours of the Breast. p.8-9.

Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. **Oncogene** 2005; 24:7443-54.

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.

Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. **Biochem J** 2000; 350:1-18.

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

Li SR, Gyselman VG, Lalude O, Dorudi S, Bustin SA. Transcription of the inositol polyphosphate 1-phosphatase gene (INPP1) is upregulated in human colorectal cancer. **Mol Carcinog** 2000; 27:322-9.

Lim MA, Riedel H, Liu F. Grb10: more than a simple adaptor protein. **Front Biosci** 2004; 9:387-403.

Liu R, Pu DM, Cheng YX, Yin L. [Expressions of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in cervical carcinoma and correlation thereof with the invasion and metastasis of the cancerous tissues]. [abstracts] **Zhonghua Yi Xue Za Zhi** 2007; 87:1326-9.

Liu P, Cheng H, Santiago S, et al. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. **Nat Med** 2011; 17:1116-20.

Logullo AF, Nonogaki S, Pasini FS, Osório CA, Soares FA, Brentani MM. Concomitant expression of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in breast ductal carcinoma: association with progression. **Oncol Rep** 2010; 23:313-20.

Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology** 2010; 57:171-92.

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.

McCann JA, Zheng H, Islam A, Goodyer CG, Polychronakos C. Evidence against GRB10 as the gene responsible for Silver-Russell syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 286:943-8.

Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer. **Oncogene** 2005; 24:7465-74.

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

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

Medinfographics. **Breast cancer incidence and mortality by age**. Available from: <URL:<http://www.medinfographics.com/cancer-statistics/breast-cancer/breast-cancer-incidence-and-mortality-by-age/>> [2013 maio 20].

Miller W. Initiating breast cancer by PIK3CA mutation. **Breast Cancer Res** 2012; 14:301.

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.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

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.

Müller BM, Kronenwett R, Hennig G, et al. Quantitative determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 mRNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue--a new option for predictive biomarker assessment in breast cancer. **Diagn Mol Pathol** 2011; 20:1-10.

Nadler Y, Gonzalez M, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y. Growth factor receptor-bound protein-7 (Grb7) as a prognostic marker and therapeutic target in breast cancer. **Ann Oncol** 2010; 21:466-73.

Nakhlis F, Morrow M. Ductal carcinoma in situ. **Surg Clin North Am** 2003; 83:821-39.

Nantel A, Mohammad-Ali K, Sherk J, Posner BI, Thomas DY. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. **J Biol Chem** 1998; 273:10475-84.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. **Science** 2004; 303:1483-7.

Novus biologicals. **GRB10 products.** Available from: <URL:<http://www.novusbio.com/GRB10>> [2012 out 10].

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

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

Osório CABT, Chaves Júnior MA, Soares FA. Avaliação de resposta patológica em câncer de mama após quimioterapia neoadjuvante: padronização de protocolo adaptado. **J Bras Patol Med Lab** 2012; 48:447-53.

Park BK, Zeng X, Glazer RI. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. **Cancer Res** 2001; 61:7647-53.

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

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.

Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. **Science** 2000; 287:1606-9.

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

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.

Pinder SE, Duggan C, Ellis IO, et al. A new pathological system for grading DCIS with improved prediction of local recurrence: results from the UKCCCR/ANZ DCIS trial. **Br J Cancer** 2010; 103:94-100.

Pinder SE, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Rutgers E, Morrow M. Microinvasive carcinoma. In: Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4). p.96-7.

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.

Polyak K. Is breast tumor progression really linear? **Clin Cancer Res** 2008; 14:339-41.

Polyak K. Molecular markers for the diagnosis and management of ductal carcinoma in situ. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2010; 2010:210-13.

Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas - a tool for pathology. **J Pathol** 2008; 216:387-93.

Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010, 12:R68

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.

Ringel MD, Hayre N, Saito J, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:6105-11.

Rodriguez-Viciano P, Sabatier C, McCormick F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. **Mol Cell Biol** 2004; 24:4943-54.

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.

Scharf PJ, Witney J, Daly R, Lyons BA. Solution structure of the human Grb14–SH2 domain and comparison with the structures of the human Grb7–SH2/erbB2 peptide complex and human Grb10–SH2 domain. **Protein Sci** 2004; 13:2541-6.

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

Schnitt SJ, Allred C, Britton P, et al. Intraductal proliferative lesions. In: Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012a. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4). p.82-9.

Schnitt SJ, Allred C, Britton P et al. Ductal carcinoma in situ. In: Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012b. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4). p.90-4.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol** 2006; 7:3.

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.

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.

Seth A, Kitching R, Landberg G, Xu J, Zubovits J, Burger AM. Gene expression profiling of ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors. **Anticancer Res** 2003; 23:2043-51.

Shen TL, Guan JL. GRB7 in intracellular signaling and its role in cell regulation. **Front Biosc** 2004; 9:192-200.

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 protooncogene in human breast and ovarian cancer. **Science** 1989; 244:707-12.

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 H 3rd, 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.

Stein EG, Gustafson TA, Hubbard SR. The BPS domain of Grb10 inhibits the catalytic activity of the insulin and IGF1 receptors. **FEBS Lett** 2001; 493:106-11.

Sun M, Wang G, Paciga JE, et al. AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. **Am J Pathol** 2001; 159:431-7.

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.

Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10983-5.

Tezuka N, Brown AMC, Yanagawa S. GRB10 binds to LRP6, the Wnt co-receptor and inhibits canonical Wnt signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 356:648-54.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature** 1999; 398:422-6.

The Human Protein Atlas. **15156 genes with protein expression profiles based on 18707 antibodies**. Search. Available from: <URL:<http://www.proteinatlas.org/>> [2012a dez 11].

The Human Protein Atlas. **Gene and protein summary**. Available from: <URL:<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000106070>> [2012b dez 11].

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:740-6.

Tian Q, Feetham MC, Tao WA et al. Proteomic analysis identifies that 14-3-3 ζ interacts with β -catenin and facilitates its activation by Akt. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:15370-5.

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.

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

Vincent-Salomon A, Thiery JP. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. **Breast Cancer Res** 2003; 5:101-6.

Vogel VG. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. **Menopause** 2008; 15(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.

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.

Weston CR, Davis RJ. Signal transduction: signaling specificity- a complex affair. **Science** 2001; 292:2439-40.

Wolff AC, Hammond MEH, 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. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:18-43.

Yu KD, Shen ZZ, Shao ZM. The immunohistochemically “ER-negative, PR-negative, HER2-negative, CK5/6-negative, and HER1-negative” subgroup is not a surrogate for the normal-like subtype in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 118:661-3.

Yuan W, Stawiski E, Janakiraman V, et al. Conditional activation of *Pik3ca*^{H1047R} in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. **Oncogene** 2013; 32:318-26.

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 - Lista dos 57 genes diferencialmente expressos entre as amostras progressão ($p < 0,05$ e $fold\ change \geq |2|$), pertencentes às vias de sinalização WNT, PI3K e processo EMT.

Nome do Gene	Fold	Nome do Gene	Fold
<i>FANCD2</i>	5,536	<i>GDAP1</i>	-3,689
<i>HOXB5</i>	2,013	<i>MYB</i>	-3,160
<i>CAMK4</i>	2,063	<i>RBM6</i>	-2,615
<i>CTSC</i>	2,141	<i>EIF4G2</i>	-2,368
<i>WNT1</i>	2,957	<i>MMP10</i>	-2,300
<i>CR2</i>	2,318	<i>DLEC1</i>	2,241
<i>BRCA2</i>	2,347	<i>MAP2</i>	2,302
<i>NGFB</i>	2,397	<i>SALL1</i>	2,323
<i>RORB</i>	2,496	<i>HOXA7</i>	2,420
<i>FGF8</i>	2,567	<i>CYP11A1</i>	2,431
<i>CHRNA7</i>	2,577	<i>EDN1</i>	2,479
<i>MAP3K12</i>	2,581	<i>NR0B2</i>	2,496
<i>PRKACG</i>	2,671	<i>COL5A1</i>	2,518
<i>LRAT</i>	2,784	<i>DLL1</i>	2,608
<i>CALCA</i>	2,849	<i>INPP1</i>	2,624
<i>PTCH</i>	3,055	<i>WNT10B</i>	2,629
<i>CSEN</i>	3,076	<i>LICAM</i>	2,722
<i>NPY</i>	3,168	<i>PAX4</i>	2,757
<i>WISP2</i>	3,246	<i>ALDH1A2</i>	2,775
<i>MAPK8</i>	3,712	<i>MBP</i>	2,976
<i>ITPKC</i>	4,950	<i>NCAM2</i>	3,036
<i>RCD-8</i>	-2,823	<i>GDAP1</i>	-3,689
<i>PCDHA8</i>	3,131	<i>TNFRSF8</i>	3,472
<i>PAX6</i>	3,171	<i>CD79A</i>	3,490
<i>ADH4</i>	3,215	<i>RELN</i>	3,505
<i>FCGR1A</i>	3,315	<i>GRB10</i>	3,511
<i>NRG2</i>	3,343	<i>DSCR1L2</i>	3,611
<i>HOXA1</i>	3,949	<i>MTA1</i>	4,432
<i>HTR2A</i>	4,096	<i>OPN1LW</i>	5,275

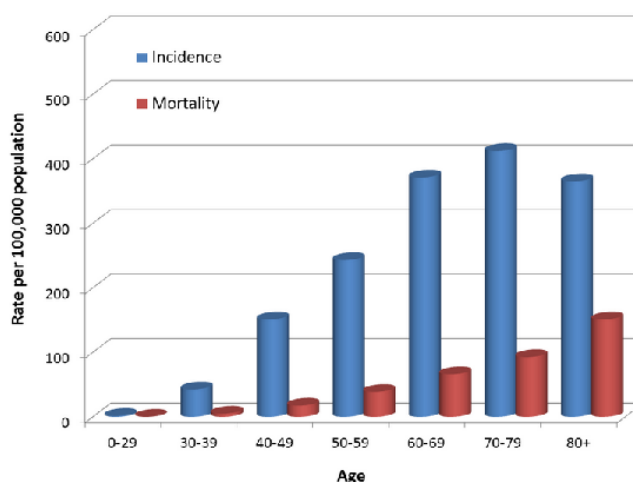
Fonte: CASTRO (2008)

Anexo 2 - Caracterização das amostras do TMA CDIS (1)

A frequência das características clínico-patológicas das amostras CDIS que compõem o TMA 1 está apresentada a seguir. Como foi citado anteriormente, foram avaliados neste TMA CDIS (1), 77 casos de pacientes com diagnóstico de CD, sendo que 40 casos correspondem ao grupo de lesão CDIS puro e 37 casos ao grupo de lesão CDIS associada a CDI.

Frequência da distribuição etária das pacientes com amostras CDIS

Para fins estatísticos, os grupos etários foram distribuídos em duas categorizações. Uma, mais estratificada, denominada categorização 1 (< 30, 31-50, 51-80 e > 80 anos), tendo como base estudos epidemiológicos em câncer de mama (Figura A2.1). A outra, menos estratificada, denominada categorização 2 (< 35, 36-50 e > 50). A maioria das pacientes que compõem o banco de amostras CDIS apresenta idade que varia entre 31 e 50 anos (50,0%), e entre 36-50 anos (48,1%), como demonstram as Tabelas A2.1 e A2.2.



Fonte: MEDINFOGRAPHICS (2013)

Figura A2.1 - Incidência e mortalidade do câncer de mama por idade em mulheres norte-americanas/ por 100.000 habitantes.

Tabela A2.1 - Frequência dos grupos etários das pacientes nas amostras CDIS.

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	2	2,6	3,7
	1	27	35,1	50,0
	2	24	31,2	44,4
	3	1	1,3	1,9
	Total	54	70,1	100,0
Perdidos		23	29,9	
Total		77	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: Categorização 1- 0: < 30; 1: 31-50; 2: 51-80; 3: >80 anos

Tabela A2.2 - Frequência dos grupos etários das pacientes nas amostras CDIS.

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	3	3,9	5,6
	1	26	33,8	48,1
	2	25	32,5	46,3
	Total	54	70,1	100,0
Perdidos		23	29,9	
Total		77	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: categorização 2- 0: < 35; 1:36-50; 2: >50

Frequência dos graus nuclear e histológico nas amostras CDIS

O grau histológico do CDIS foi determinado pelo critério de grau nuclear (item 1.4), como não alto (graus nucleares 1 e 2) e alto grau (grau nuclear 3). Observa-se frequência discretamente maior de pacientes (52,8%) com CDIS de alto grau nuclear e histológico, como demonstra a Tabela A2.3. Podemos visualizar graficamente estes dados em Anexo 5.

Tabela A2.3 - Frequência dos graus nuclear e histológico nas amostras CDIS

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	34	44,2	47,2
	1	38	49,4	52,8
	Total	72	93,5	100,0
Perdidos		5	6,5	
Total		77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização); NAG (Não alto grau); AG (Alto grau)

Legenda: 0 – NAG; 1 – AG.

Frequência do tipo histológico nas amostras CDIS

O tipo histológico foi classificado segundo a presença ou ausência de comedocarcinoma, caracterizado por tratar-se de CDIS de alto grau nuclear, associado a comedonecrose (item 1.4). Dos casos válidos analisados, 88,6% foram classificados como sendo do tipo histológico não comedo, observados na Tabela A2.4.

Tabela A2.4 - Frequência do tipo histológico nas amostras CDIS

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	62	80,5	88,6
	1	8	10,4	11,4
	Total	70	90,9	100,0
Perdidos		7	9,1	
Total		77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: 0 – não comedo; 1 – comedo.

Frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de estrógeno nas amostras CDIS

A expressão imunoistoquímica do RE (item 3.7.2), foi considerada positiva em 66,7% dos casos válidos, como podemos observar na Tabela A2.5.

Tabela A2.5 - Frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de estrógeno nas amostras CDIS

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	22	28,6	33,3
	1	44	57,1	66,7
	Total	66	85,7	100,0
Perdidos		11	14,3	
Total		77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: 0 – negativo; 1 – positivo.

Frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de progesterona nas amostras CDIS

A expressão imunoistoquímica do RP (item 3.7.2) foi considerada positiva em 53,0% dos casos válidos, como podemos observar na Tabela A2.6.

Tabela A2.6 - Frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de progesterona nas amostras CDIS

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	31	40,3	47,0
	1	35	45,5	53,0
	Total	66	85,7	100,0
Perdidos		11	14,3	
Total		77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: 0 – negativo; 1 – positivo.

Frequência do teste HER2 nas amostras CDIS

A reação de FISH descrita no item 3.8, foi executada nas amostras de CDIS para obtenção do *status* ou teste HER2 nesse tipo tumoral. Para o teste HER2 ser considerado positivo, prevaleceu o resultado de FISH positivo, quando há presença

de amplificação do gene *HER2* (item 1.5.5), ou o resultado do exame IIQ positivo 3+, segundo os critérios da ASCO/CAP 2007 (WOLFF et al. 2007), para os casos de FISH não avaliável. O status HER2 negativo foi o mais freqüente nos casos CDIS válidos (57,1%), como está demonstrado na Tabela A2.7.

Tabela A2.7 - Frequência do teste HER2 nas amostras CDIS

CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos 0	40	51,9	57,1
1	23	29,9	32,9
2	7	9,1	10
Total	70	90,9	100,0
Perdidos	7	9,1	
Total	77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: 0 – negativo; 1 – positivo; 2- indeterminado.

Frequência da expressão imunoistoquímica de Ki67 nas amostras CDIS

A expressão imunoistoquímica de Ki67 foi também realizada nos casos de CDIS. Utilizamos duas categorizações distintas. Categorização 1: 0- negativo; 1- baixa expressão (1-15% das células neoplásicas com expressão nuclear positiva); 2- alta expressão (>15% das células neoplásicas com expressão nuclear positiva). Categorização 2: 0- <15% das células neoplásicas com expressão nuclear positiva; 1- \geq 15% de células neoplásicas com expressão nuclear positiva. Observamos um predomínio de casos CDIS válidos com baixa expressão imunoistoquímica nuclear de Ki67 em 58,7% e 88,9%, nas categorizações 1 e 2, respectivamente (Tabelas A2.8 e A2.9).

Tabela A2.8 - Frequência da expressão imunoistoquímica de Ki67 nas amostras CDIS.

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	19	24,7	30,2
	1	37	48,1	58,7
	2	7	9,1	11,1
	Total	63	81,8	100,0
Perdidos		14	18,2	
Total		77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: Categorização 1- 0- negativo; 1- baixa expressão (1-15%);
2- alta expressão (>15%).

Tabela A2.9 - Frequência da expressão imunoistoquímica de Ki67 nas amostras CDIS.

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	56	72,7	88,9
	1	7	9,1	11,1
	Total	63	81,8	100,0
Perdidos	NA	14	18,2	
Total		77	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: Categorização 2 – 0- expressão <15%; 1- expressão ≥15%

Associação entre a frequência dos grupos de lesões CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI) e as características clínico-patológicas

A seguir, demonstramos a associação entre a frequência dos grupos de lesões CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI válidos e suas características clínico-patológicas. Observamos que um maior número de casos CDIS puro apresenta expressão positiva de RE e de RP (72,2% e 58,3%, respectivamente). Há uma maior frequência de casos que apresentam status HER2 negativo (após a realização de FISH) nos dois grupos de lesões (56,8% no CDIS puro e 57,6% no CDIS-CDI).

Entre os dois grupos de lesões, observa-se que o grupo CDIS puro apresenta maior frequência de baixa expressão de Ki67 (expressão em 1-15% das células neoplásicas), quando comparado com o grupo CDIS-CDI (64,5% e 53,1%, respectivamente). O alto grau nuclear foi mais frequente no grupo CDIS-CDI (61,8%). A maioria dos casos CDIS puro não apresenta necrose (71,1%) e é do tipo histológico não comedo (97,3%). Dentre as variáveis estudadas, o tipo histológico (comedo e não comedo) foi a única com *p* valor com significância estatística (*p*=0,02*). As demais características clínico-patológicas não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Estes resultados são observados na Tabela A2.10.

Tabela A2.10 – Associação entre a frequência dos grupos de lesões CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI e as características clínico-patológicas

Variável	categoria	Invasão associada (0=Não; 1=Sim)		<i>P</i>
		Não (CDIS puro)	Sim (CDIS-CDI)	
RE (0=negativo; 1=positivo)	0	10 (27,8%)	12 (40,0%)	0,29
	1	26 (72,2%)	18 (60,0%)	
RP (0=negativo; 1=positivo)	0	15 (41,7%)	16 (53,3%)	0,34
	1	21 (58,3%)	14 (46,7%)	
<i>Status</i> HER2 (0=negativo 1=positivo; 2=indeterminado)	0	21 (56,8%)	19 (57,6%)	0,97
	1	12 (32,4%)	11 (33,3%)	
	2	4 (10,8%)	3 (9,1%)	
Ki67 [0=negativo; 1 (baixa expressão=1-15%) 2 (alta expressão>15%)]	0	7 (22,6%)	12 (37,5%)	0,43
	1	20 (64,5%)	17 (53,1%)	
	2	4 (12,9%)	3 (9,4%)	
Grau nuclear (0=NAG; 1=AG)	0	21 (55,3%)	13 (38,2%)	0,14
	1	17 (44,7%)	21 (61,8%)	
Necrose (não=0; sim=1)	0	27 (71,1%)	21 (61,8%)	0,40
	1	11 (28,9%)	13 (38,2%)	
Tipo histológico (não comedo=0; comedo=1)	0	36 (97,3%)	26 (78,8%)	0,02*
	1	1 (2,7%)	7 (21,2%)	

Legenda: (*) = *p*<0,05

Anexo 3 - Caracterização das amostras dos TMAs CDI (2 e 3)

Foram incluídos neste estudo, 411 casos de pacientes com diagnóstico de CDI. Apresentamos abaixo, a frequência das características clínico-patológicas das amostras que compõem os TMAs 2 e 3.

Frequência dos grupos etários das pacientes que compõem os TMAs CDI (2 e 3)

Para fins estatísticos, os grupos etários foram distribuídos em duas categorizações, como foi descrito no item 3.9.1. A maioria das pacientes que compõem o banco de amostras CDI (TMAs 2 e 3) apresenta idade que varia entre 51 e 80 anos (55,3%) e >50 anos (58,8%) nas respectivas categorizações, como demonstram as Tabelas A3.1 e A3.2.

Tabela A3.1 - Frequência dos grupos etários das pacientes que compõem as amostras CDI.

CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos 0	4	1,0	1,0
1	162	39,4	40,2
2	223	54,3	55,3
3	14	3,4	3,5
Total	403	98,1	100,0
Perdidos	8	1,9	
Total	411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: Categorização 1- 0:< 30; 1: 31-50; 2: 51-80; 3: >80 anos.

Tabela A3.2 - Frequência dos grupos etários das pacientes que compõem as amostras CDI.

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	16	3,9	4,0
	1	150	36,5	37,2
	2	237	57,7	58,8
	Total	403	98,1	100,0
Perdidos		4	1,9	
Total		411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: Categorização 2- 0:< 35; 1:36-50; 2 >50.

Frequência do grau histológico de SBR modificado nos TMAs compostos por amostras CDI

O grau histológico da neoplasia representada nas amostras de CDI (TMAs 2 e 3) foi determinado pelo sistema de graduação histológica de SBR modificado (item 1.2). Observa-se maior frequência de pacientes com CDI grau 2 de SBR modificado (56,5%), como demonstra a Tabela A3.3.

Tabela A3.3 - Frequência do grau histológico de SBR modificado nos TMAs compostos por amostras CDI.

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	1	77	18,7	19,3
	2	226	55,0	56,5
	3	97	23,6	24,3
	Total	400	97,3	100,0
Perdidos		11	2,7	
Total		411	100,0	

Abreviações: CAT (Categorização)

Legenda: 1 - SBR grau 1; 2 - SBR grau 2; 3- SBR grau 3.

Frequência do número de linfonodos axilares comprometidos por metástase/paciente que compõem as amostras CDI

Para a análise estatística, o número de linfonodos axilares dissecados comprometidos por metástase/paciente foi distribuído em dois grupos, assim categorizados: 0 - ≤ 3 linfonodos; 1 - > 3 linfonodos. Em 62,7% das pacientes portadoras de CDI, o número de linfonodos positivos dissecados foi ≤ 3 , sendo observado na Tabela A3.4.

Tabela A3.4 - Frequência do número de linfonodos axilares comprometidos por metástase/paciente que compõe as amostras CDI.

CAT	Frequência (n° casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos 0	225	54,7	62,7
1	134	32,6	37,3
Total	359	87,3	100,0
Perdidos	52	12,7	
Total	411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 - ≤ 3 linfonodos positivos; 1 - > 3 linfonodos positivos.

Frequência do estadiamento clínico das pacientes portadoras de CDI

O estadiamento clínico das pacientes portadoras de CDI foi realizado baseado no sistema de TNM (Quadro 1). Observamos na Tabela A3.5 que 59,9% das pacientes encontravam-se em estágio mais avançado ao diagnóstico.

Tabela A3.5 - Frequência do estadiamento clínico das pacientes portadoras de CDI.

CAT	Frequência (n° casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos 0	155	37,7	38,7
1	246	59,9	61,3
Total	401	97,6	100,0
Perdidos	10	2,4	
Total	411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 - estádios 1 e 2; 1 - estádios 3 e 4.

Frequência de componente CDIS associado nos TMAs compostos por amostras CDI

Das amostras válidas CDI examinadas nos TMAs 2 e 3, 65,9% não apresentam componente CDIS associado avaliável, como observamos na Tabela A3.6.

Tabela A3.6 - Frequência de componente CDIS associado nos TMAs compostos por amostras CDI

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	211	51,3	65,9
	1	109	26,5	34,1
	Total	320	77,9	100,0
Perdidos		91	22,1	
Total		411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: CDIS associado 0 - não; 1 - sim.

Frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de estrógeno nos TMAs compostos por amostras CDI

A expressão imunoistoquímica do RE foi considerada positiva em 67,4% dos casos válidos de CDI (TMAs 2 e 3), como podemos observar na Tabela A3.7. Os critérios para a análise da expressão imunoistoquímica do RE, são descritos no item 3.7.2.

Tabela A3.7 - Frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de estrógeno nos TMAs compostos por amostras CDI

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	123	29,9	32,6
	1	254	61,8	67,4
	Total	377	91,7	100,0
Perdidos		34	8,3	
Total		411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 - negativo; 1 - positivo.

Frequência da expressão imunistoquímica do receptor de progesterona nos TMAs compostos por amostras CDI

A expressão imunistoquímica do RP apresentou um discreto predomínio de casos negativos válidos (52,6%), como podemos observar na Tabela A3.8. Os critérios para a análise da expressão imunistoquímica do RP são descritos no item 3.7.2.

Tabela A3.8 - Frequência da expressão imunistoquímica do receptor de progesterona nos TMAs compostos por amostras CDI

CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos 0	185	45,0	52,6
1	167	40,6	47,4
Total	352	85,6	100,0
Perdidos	59	14,4	
Total	411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 – negativos; 1 – positivos.

Frequência do teste HER2 nos TMAs compostos por amostras CDI

A reação de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) descrita no item 3.8, foi executada nas amostras de CDI (TMAs 2 e 3) para obtenção do *status* ou teste HER2 neste tipo tumoral. Para o teste HER2 ser considerado positivo, prevaleceu o resultado de FISH positivo, quando há presença de amplificação do gene *HER2* (item 1.5.5); nos casos de FISH não avaliável, prevaleceu o resultado do exame IIQ positivo 3+, segundo os critérios da ASCO/CAP 2007 (WOLFF et al. 2007). O *status* HER2 negativo foi mais frequente nos casos CDI válidos (85,1%), como está demonstrado na Tabela A3.9.

Tabela A3.9 - Frequência do teste HER2 nos TMAs compostos por amostras CDI

	CAT	Frequência (n° casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	326	79,3	85,1
	1	57	13,9	14,9
	Total	383	93,2	100,0
Perdidos		28	6,8	
Total		411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 – casos com teste HER2 negativo; 1 – casos com teste HER2 positivo.

Frequência da expressão imunoistoquímica da citoceratina 5/6 nos TMAs compostos por amostras CDI

A expressão imunoistoquímica da citoceratina 5/6 foi analisada nos TMAs CDI (2 e 3), como descrito no item 3.7.2, sendo que a expressão negativa predominou em 76,9% dos casos válidos. A frequência pode ser observada na Tabela A3.10.

Tabela A3.10 - Frequência da expressão imunoistoquímica da citoceratina 5/6 nos TMAs compostos por amostras CDI

	CAT	Frequência (n° casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	306	74,5	76,9
	1	92	22,4	23,1
	Total	398	96,8	100,0
Perdidos		13	3,2	
Total		411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 – negativos; 1 – positivos.

Frequência da expressão imunoistoquímica do EGFR nos TMAs compostos por amostras CDI

A expressão imunoistoquímica do EGFR foi analisada nos TMAs CDI (2 e 3), como descrito no item 3.7.2, sendo que a expressão negativa predominou em 62,9% dos casos válidos. A frequência pode ser observada na Tabela A3.11.

Tabela A3.11 - Frequência da expressão imunoistoquímica do EGFR nos TMAs compostos por amostras CDI

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	246	59,9	62,9
	1	145	35,3	37,1
	Total	391	95,1	100,0
Perdidos		20	4,9	
Total		411	100,0	

Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0– negativo; 1– positivo.

Frequência da expressão imunoistoquímica do Ki67 nos TMAs compostos por amostras CDI

A expressão imunoistoquímica do Ki67 foi analisada nos TMAs CDI (2 e 3), como descrito no item 3.7.2, observando-se expressão >15% na maioria dos casos válidos (63,7%). A frequência pode ser observada na Tabela A3.12.

Tabela A3.12 - Frequência da expressão imunoistoquímica do Ki67 nos TMAs compostos por amostras CDI

	CAT	Frequência (nº casos)	Porcentagem (%)	Porcentagem dos casos válidos
Válidos	0	65	15,8	36,3%
	1	114	27,7	63,7%
	Total	179	43,6	100,0%
Perdidos		232	56,4	
Total		411	100,0	

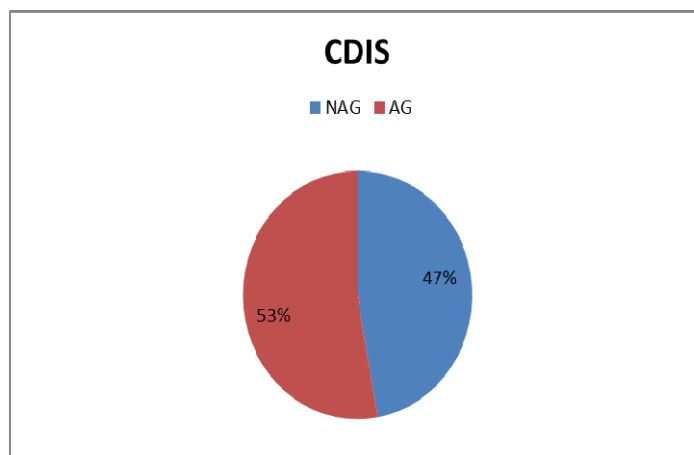
Abreviação: CAT (Categorização).

Legenda: 0 - ≤ 15%; 1 - > 15%.

Anexo 4 - Protocolo da Hibridação *in situ* Fluorescente

Para as reações de FISH, as lâminas foram desparafinizadas em xilol com três banhos de 10 minutos cada. Foram então, realizadas 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 uma e secas a TA. Foram então, aplicados 10µl da sonda para HER2 e feita a incubação no forno de hibridação para denaturação 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 a 45°C, depois mergulhadas na mesma solução a 45°C por 30 minutos e lavadas em solução de 2x SSC por dois minutos a TA. Novamente foram desidratadas em álcool 75%, 80% e 100% por dois minutos cada uma e secas a TA. Por último, foram aplicados 15µl de DAPI e feita a montagem da lamínula.

Anexo 5 - Caracterização da frequência de graus nucleares não alto grau (NAG) e alto grau (AG) das amostras CDIS do TMA (1)



Observa-se frequência discretamente maior de pacientes (53%) com CDIS de alto grau nuclear e histológico, como descrevemos no Anexo 2 (Tabela A2.3).

Anexo 6 - Protocolo das reações imunoistoquímicas (IIQs)

O bloco de TMA foi cortado em micrótomo rotativo na espessura de 5 μ m. A fita de parafina com a amostra foi estendida em banho maria histológico e colada em lâmina de vidro previamente tratada. As lâminas foram deixadas em estufa de secagem e sofreram banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.

A desparafinização dos cortes foi feita com Xilol a 60°C por 20 minutos e Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, por 24 horas em estufa 60°C. A seguir, os cortes foram hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 85% e 70%) por 30 segundos em cada solução e posteriormente lavados em água corrente e destilada por 5 minutos.

A recuperação antigênica foi feita através do calor com irradiação por panela de pressão destampada (Solar, Rapid Express, Tramontina®), utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0, segundo a padronização estabelecida para cada anticorpo. As lâminas foram mergulhadas na solução em ebulição. A panela foi lacrada com a válvula seletora de pressão no número 2. Após a pressurização total, cronometramos 3 minutos. Giramos a válvula seletora de pressão para liberação de vapor e deixamos a panela fechada sob água corrente até a despressurização total. Destampamos a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada

A seguir foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10V), com 4 trocas de 5 minutos cada. Lavamos em água corrente e destilada e após, com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubamos as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme descrito no Quadro 4, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Lavamos em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Incubamos por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido). Lavamos com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada. Incubamos com o NovoLink Polymer por 30 min a

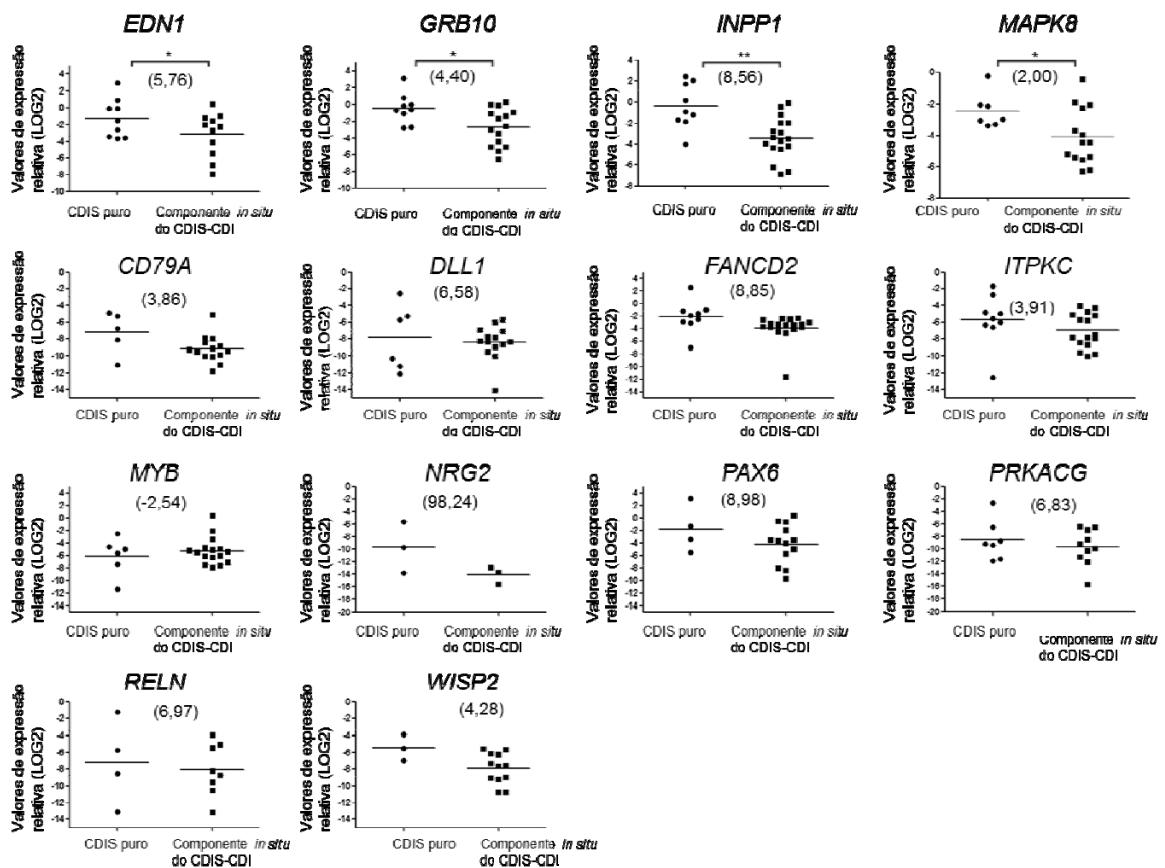
37° C. Lavamos em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Incubamos as lâminas em solução substrato: 100 mg de 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6%; 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observamos a reação nas lâminas controle ao microscópio óptico, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como seu produto final.

Lavamos em água corrente e água destilada por 3 minutos. Contracoramos com Hematoxilina de Harris (Merck®) por 1 minuto. Lavamos bem em água corrente e destilada. Imergimos 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada. Desidratamos as lâminas em: Etanol 80%, 30 segundos; Etanol 95%, 30 segundos; Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada. A seguir passamos por Xilol 4 vezes, 30 segundos cada. Realizamos a montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

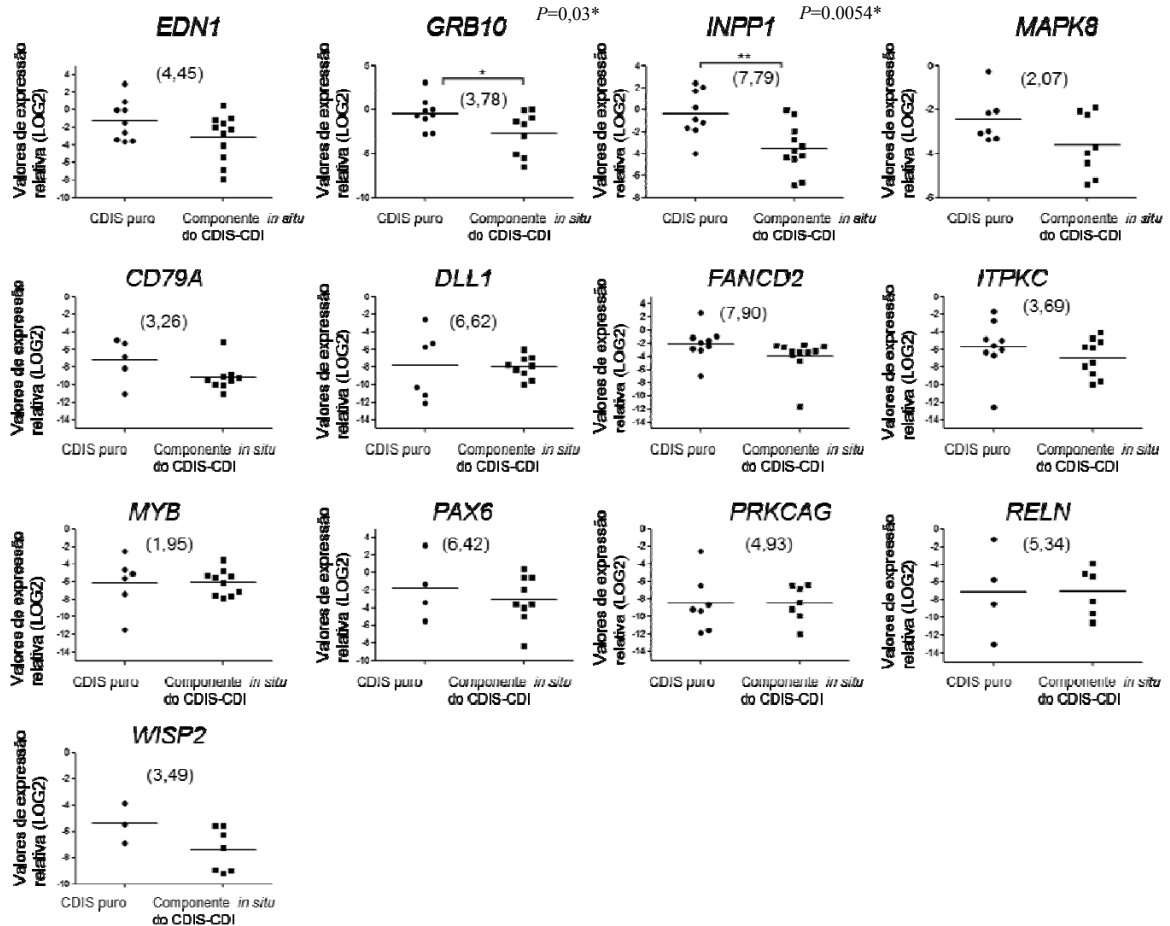
Anexo 7 - Gráficos de expressão na análise de RT-qPCR pelo sistema TLDA dos 14 genes considerando as amostras de CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI

Os gráficos de expressão relativa dos 14 genes analisados por RT-qPCR através do sistema TLDA, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray* estão aqui apresentados.



A expressão relativa foi estudada entre os grupos de lesões CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI. Todos os 14 genes representados neste gráfico apresentaram $fold\ change \geq |2|$. Os genes *GRB10*, *EDN1*, *INPP1* e *MAPK8* apresentaram $fold\ change \geq |2|$ e $p < 0,05$. Os genes *WISP2* e *CD79A* apresentaram apenas $p=0,05$, próximo da significância. Entre parênteses () estão os valores de diferença de expressão ($fold\ change$) entre CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Anexo 8 - Gráficos de expressão na análise de RT-qPCR pelo sistema TLDA considerando amostras com mesmo grau nuclear (Grau 3)



Os gráficos de 13 genes avaliados por RT-qPCR, com o sistema TLDA, com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray*, considerando amostras com o mesmo grau nuclear (grau nuclear 3), estão aqui demonstrados. Não foi possível fazer análise de *NRG2*, considerando apenas o grau 3, porque a maioria das amostras falharam com o ensaio TLDA. Entre parênteses () estão os valores de diferença de expressão (*fold change*) entre CDIS puro e o componente *in situ* do CDIS-CDI. Abreviações: CDIS, carcinoma ductal *in situ*; CDIS-CDI, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. (*) $P<0.05$, (**) $P<0.01$.

Anexo 9 - Gráfico representativo da expressão do RNAm de *GRB10* nos diferentes grupos de lesões (normal, CDIS puro, componente *in situ* do CDIS-CDI e CDI)

Os resultados do cálculo da expressão relativa (*fold change*) de *GRB10* obtidos por RT-qPCR com o ensaio TLDA, entre os grupos de lesões e o *p* valor estão descritos na Figura A. No gráfico observamos a maior expressão no CDIS puro, quando comparado ao componente *in situ* do CDIS-CDI, com $p=0,01^*$. A Tabela A demonstra os resultados comparativos da expressão relativa de *GRB10* entre os grupos de lesões, considerando todas as amostras e apenas as amostras com Grau nuclear 3.

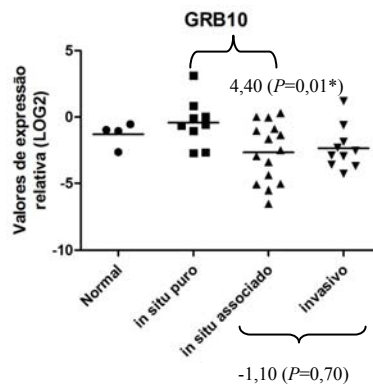


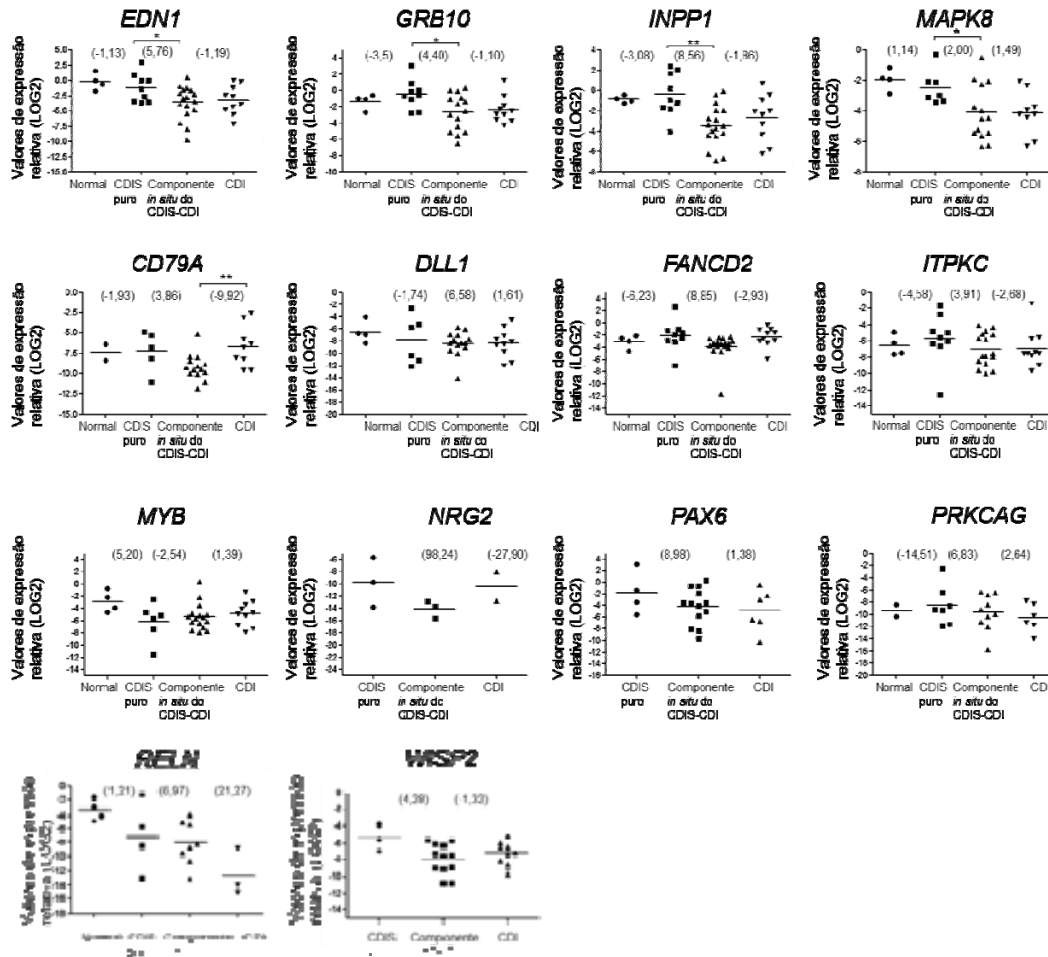
Figura A - Gráfico representativo dos resultados da expressão relativa (*fold change*) de *GRB10* obtidos RT-qPCR com ensaio TLDA ao longo da progressão. As chaves mostram os resultados de *fold change* e *p* valor para *in situ* puro/*in situ* associado e para *in situ* associado/*invasivo*). (*) $P<0,05$.

Tabela A: Expressão relativa de *GRB10* entre os grupos de lesões, considerando todas as amostras e apenas as amostras com Grau nuclear 3. (*) $P < 0,05$.

Grupos	FOLD	P	Grupos	FOLD	P	Grupos	FOLD	P
						<i>In situ</i>		
			<i>In situ puro X in situ associado</i>			associado		
Normal x <i>in situ</i> puro	-3,5	0,37	(todas as amostras)	4,40	0,01*	x		
						invasivo	-1,10	0,70
Normal x <i>in situ</i> associado	1,25	0,25	<i>In situ puro x in situ associado</i>	3,78	0,03*			
			(todos com grau 3)					
Normal x invasivo	1,13	0,94	<i>In situ</i> puro x invasivo	3,97	0,09			

Anexo 10 - Gráficos de expressão dos genes validados por RT-qPCR, ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama

Genes validados pelo ensaio TLDA:



A expressão relativa foi estudada entre os grupos de lesões (tecido normal, CDIS puro, componente in situ do CDIS-CDI e CDI). Os genes *GRB10*, *EDN1*, *INPP1* e *MAPK8* apresentaram $fold\ change \geq |2|$ e $p < 0.05$, entre CDIS puro e o componente in situ do CDIS-CDI. Todos os 14 genes representados neste gráfico apresentaram $fold\ change \geq |2|$. Os genes *WISP2* e *CD79A* apresentaram apenas $p=0,05$ próximo da significância para a avaliação entre os dois grupos CDIS puro, componente in situ do CDIS-CDI. Para os genes *NRG2*, *PAX6* e *WISP2*, não foi possível avaliar as amostras normais. Entre parênteses () estão os valores de diferença de expressão ($fold\ change$) entre os grupos de lesões. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

Abreviações: CDIS, carcinoma ductal *in situ*; CDIS-CDI, carcinoma ductal *in situ* que coexiste com o carcinoma ductal invasivo. CDI, carcinoma ductal invasivo (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$.

Anexo 11 - Esquema demonstrativo da localização no cromossomo, dos 4 genes validados por RT-qPCR através do sistema TLDA

O gene *GRB10* (*growth factor receptor-bound protein 10*) está localizado no braço curto do cromossomo 7, na posição 12.1 (7p12.1), segundo observamos na Figura A11.1

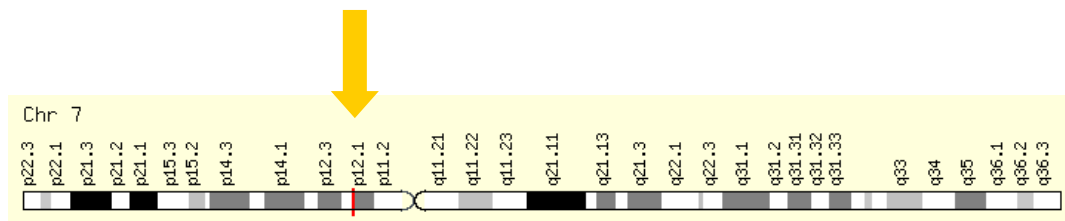


Figura A11.1 - *GRB10* (<http://www.genecards.org/index.shtml>)

O gene *MAPK8* (*mitogen-activated protein kinase 8*) está localizado no braço longo do cromossomo 10, na posição 11.22 (10q11.22), sendo observado na Figura A11.2.

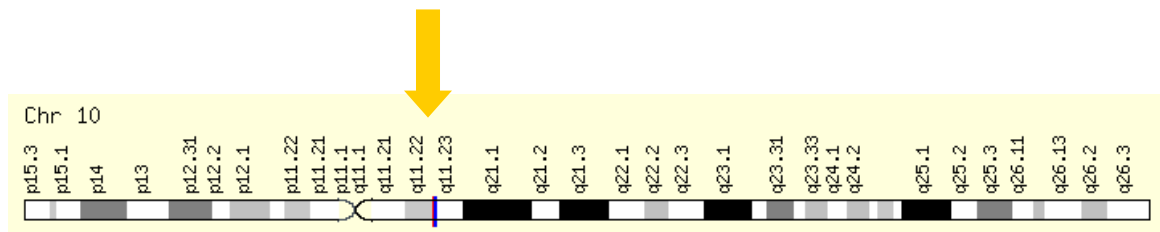


Figura A11.2 - *MAPK8* (<http://www.genecards.org/index.shtml>)

O gene *INPP1* (*inositol polyphosphate-1-phosphatase*) está localizado no braço longo do cromossomo 2, na posição 32.2 (2q32.2), esquematizado na Figura A11.3.

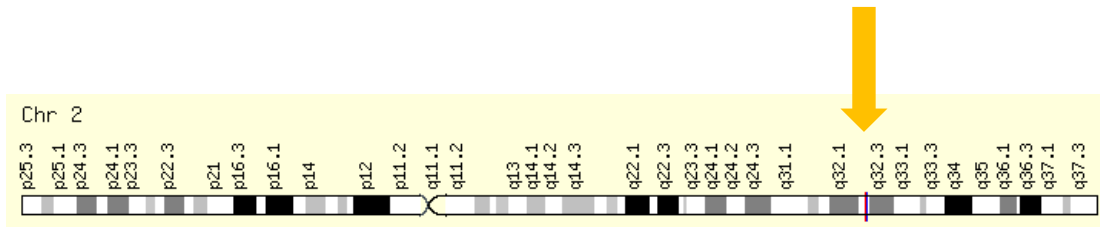


Figura A11.3 - *INPP1* (<http://www.genecards.org/index.shtml>)

O gene *EDNI* (*endothelin 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 6, na posição 24.1 (6p24.1), sendo visualizado na Figura A11.4.

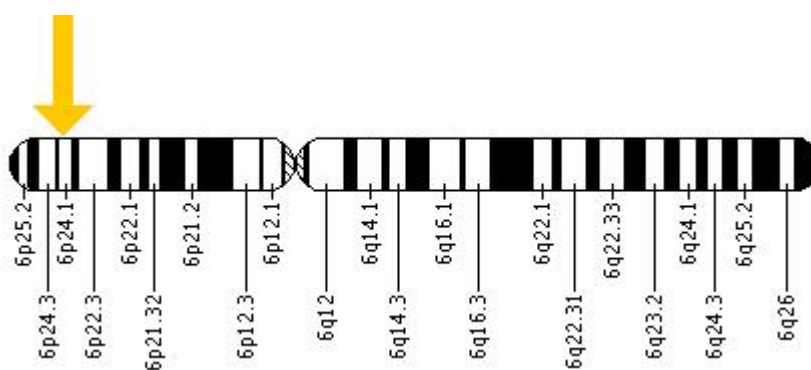
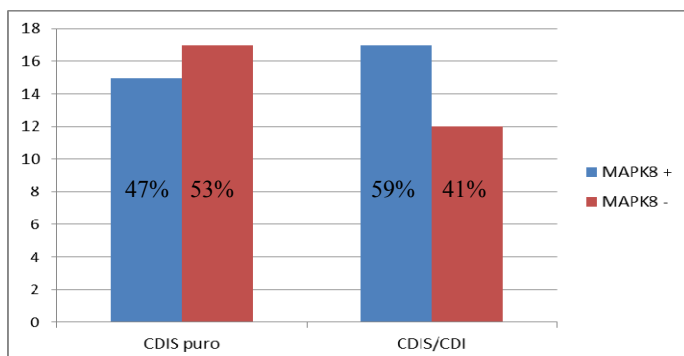
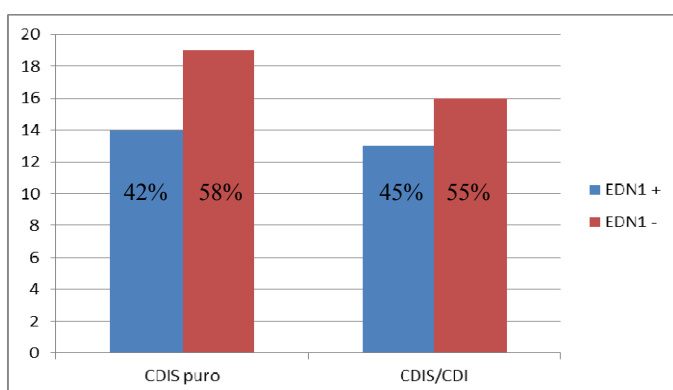


Figura A11.4 - *EDNI* (<http://www.genecards.org/index.shtml>)

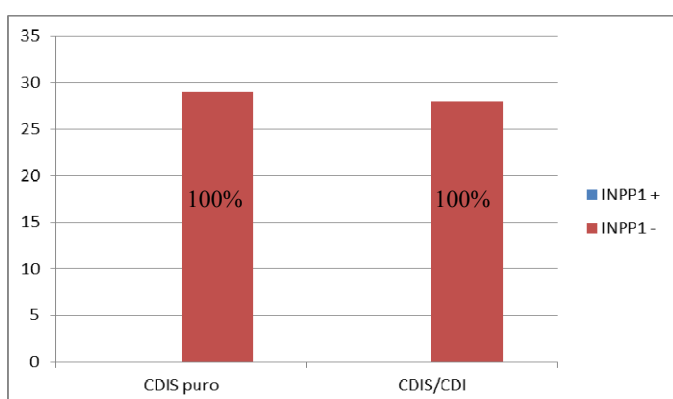
Anexo 12 - Gráficos de barras representando a frequência de expressão da proteína codificada pelos genes *MAPK8*, *EDN1* e *INPP1* nas amostras CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI analisadas por IIQ



	CDIS puro	CDIS/CDI
MAPK8 +	15	17
MAPK8 -	17	12



	CDIS puro	CDIS/CDI
EDN1 +	14	13
EDN1 -	19	16



	CDIS puro	CDIS/CDI
INPP1 +	0	0
INPP1 -	29	28

A frequência da expressão da proteína codificada pelos outros 3 genes com valores de expressão gênica concordantes com a metodologia de cDNA *microarray* (*MAPK8*, *EDN1* e *INPP1*), que apresentaram *fold change* $\geq |2|$ e $p < 0,05$, além do

GRB10 (item 4.2.8) , foi avaliada nos grupos de lesões CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI e está representada nos gráficos de barra acima. Os quadros laterais aos gráficos demonstram o número de amostras distribuídas entre os dois grupos de lesões para cada proteína. As porcentagens definidas em cada coluna representam a frequência das amostras com expressão positiva e negativa nos grupos de lesões. Observamos que 58% das amostras avaliáveis por IIQ com EDN1 apresentaram expressão negativa no CDIS puro e esta proteína não teve diferença significativa de positividade IIQ entre os grupos CDIS puro e componente *in situ* do CDIS-CDI. MAPK8 apresentou maior expressão proteica no componente *in situ* do CDIS-CDI do que no CDIS puro (53% dos casos avaliáveis) e a expressão da proteína INPP1 foi negativa em 57 (100%) amostras avaliáveis.

Anexo 13 - A proteína codificada pelo gene *GRB10*

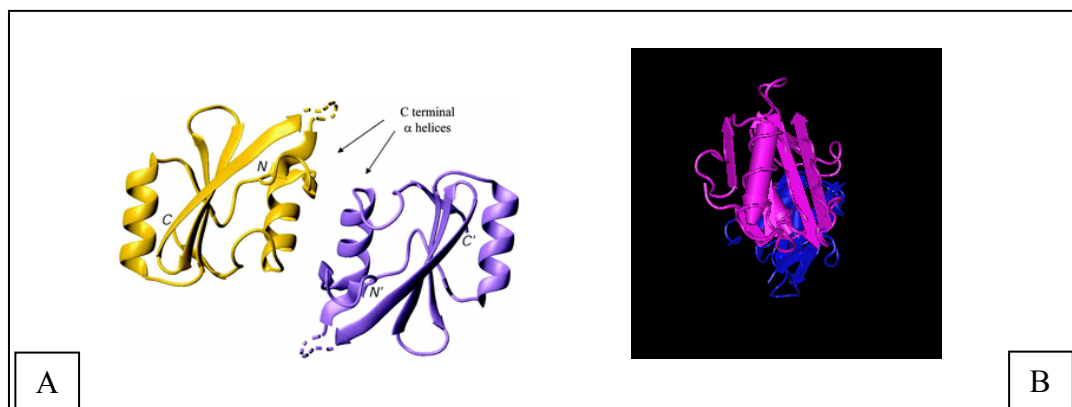
Os receptores mais estudados são os de Insulina (receptores para o Fator de Crescimento ligado à Insulina, IGF-IR), receptores para o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGFR), receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e os receptores para o Fator de Crescimento Endotelial (VEGFR). A maioria das pesquisas tem utilizado linhagens celulares para compreender a participação destas proteínas de ligação no metabolismo da insulina e diabetes, nas anormalidades de crescimento e no desenvolvimento de tumores responsivos ao IGF-I (LIM et al. 2004; DI PAOLA et al. 2006; MCCANN et al. 2001).

A proteína GRB10 é formada pelos domínios: SH2 (“*Src homology 2*”), PH (“*pleckstrin homology*”), BPS (“*Between the PH and SH2 domains*”), P (“*Proline-rich region*”) e RA (“*Ras-association*”) (HOLT e SIDDLE 2005). O domínio SH2 localiza-se na região C-terminal, importante para as interações com os receptores tirosina-quinase e outras proteínas de sinalização intracelular (HANSEN et al. 1996). O domínio BPS possui aproximadamente 80 aminoácidos e localiza-se entre os domínios PH e SH2 (HE TC et al. 1998). Esse domínio possui a função de ligar-se aos receptores ativados de Insulina e IGF-I, juntamente com o domínio SH2 (HANSEN et al. 1996) e inibir a sinalização intracelular promovida pela ativação desses receptores (STEIN et al. 2001). O domínio PH localiza-se entre os domínios BPS e RA, facilitando a localização desta proteína na membrana plasmática, através de sua interação com fosfolipídeos da membrana (LEMMON e FERGUSON 2000). O domínio RA está localizado entre os domínios PH e P e sugere-se que este domínio permita a ligação de proteínas da superfamília Ras (regulam vias intracelulares que controlam múltiplos processos biológicos na célula) à proteína Grb10 (RODRIGUEZ-VICIANA et al. 2004). Por último, o domínio P está localizado na região N-terminal, contendo trechos de prolina. Estudos têm demonstrado que as proteínas GIGYF1 e GIGYF2 (“*Grb10 interacting GYF protein 1 and 2*”) associam-se a este domínio. Além disso, a estimulação com IGF-I aumenta essa associação, mas não se conhece a função biológica dessa interação (GIOVANNONE et al. 2003). Os domínios descritos têm como função, ora o recrutamento, ora a ligação e a modulação entre as proteínas. GRB10 tem propensão à oligomerização, sendo detectadas formas diméricas e tetraméricas, inativas. Os tetrâmeros são formados pela ligação das subunidades SH2

e PH de uma proteína à região N-terminal de outra. O sinal que desencadeia a dissociação dos tetrâmeros em monômeros (forma ativa) é a ligação de fatores de crescimento aos receptores tirosina-quinase e consequente ativação destes receptores (DONG et al. 1998). Várias isoformas da proteína codificada pelo gene *GRB10* (*Homo sapiens*) são reconhecidas: as isoformas “a” com 594 amino ácidos (aa), locus NP_005302, “b” com 548 aa, locus NP_001001549, “c” com 536 aa, locus NP_001001550, “CRA_a” com 594 aa, locus EAW60967, “CRA_b” com 588 aa, locus EAW60965, “CRA_c” com 548 aa, locus EAW60966, “CRA_d” com 536 aa, locus EAW60968, “interacting GYF protein 1” com 1035 aa, locus AAO46888, “Grb-IR-related splice variant 1” com 536 aa, locus AAC50671, “interacting GYF protein 2” com 1299 aa, locus AAO46889 e “interacting GYF protein 2” com 1298 aa, locus AAI36252 (**GeneBank and Protein Tools**. <URL:<http://www.ncbi.nlm.gov/protein>>. [2013 jan 11]).

As interações químicas e a estrutura cristalina da proteína GRB10

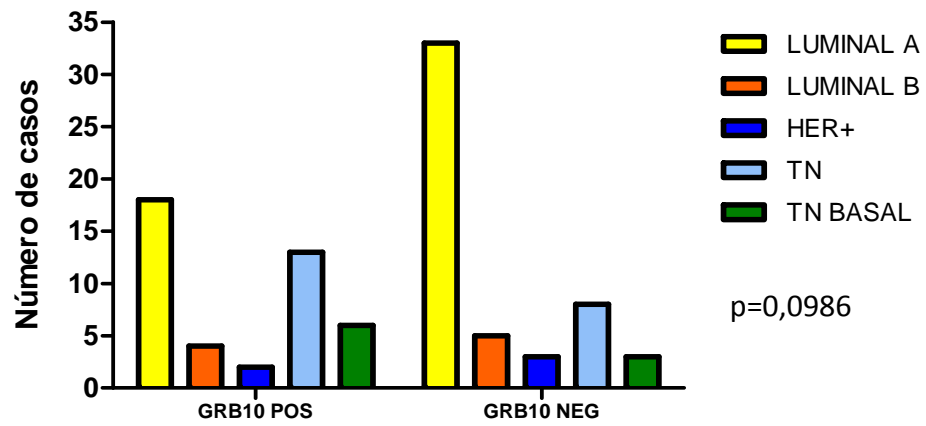
As interações químicas e a estrutura cristalina estão demonstrados na Figura abaixo.



Legenda: (A) Interação de 2 moléculas de proteína. (B) Estrutura cristalina 3D do domínio SH2 de Grb10 (forma dimérica). **Fonte:** (A) Retirado de (HOLT e SIDDLE 2005) (B) Retirado de NCBI.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>

Anexo 14 - A expressão imunohistoquímica de GRB10 e o imunofenótipo molecular nos TMAs CDI (2 e 3).

A



B

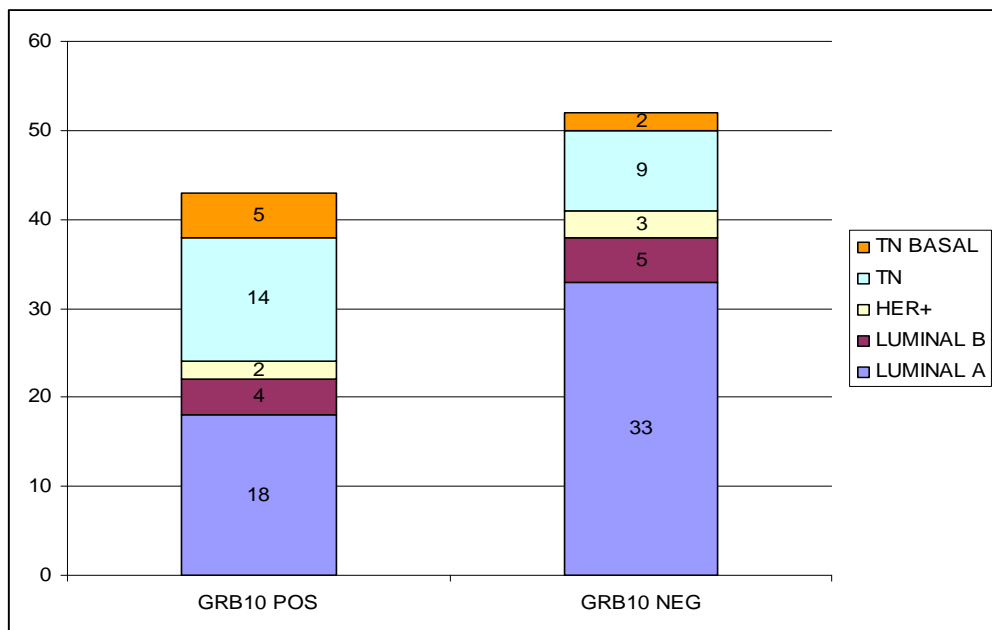


Tabela A14.1

	LUMINAL A	LUMINAL B	HER2	TN	TN BASAL	TOTAL
GRB10 POS	18	4	2	14	5	43
GRB10 NEG	33	5	3	9	2	52
TOTAL	51	9	5	23	7	95

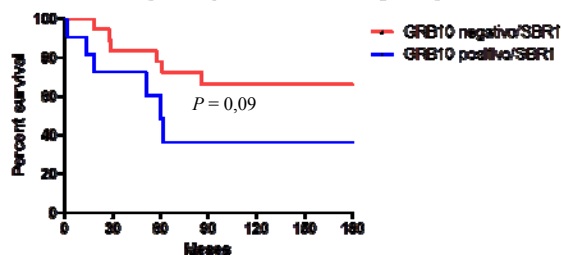
Gráficos A e B: Gráficos de barras representando a associação entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e a distribuição das amostras CDI (TMAs 2 e 3), segundo o imunofenótipo molecular. A) A negatividade de GRB10 associou-se com um maior número de casos com imunofenótipo luminal A, porém sem significância estatística. ($P=0,0986$). B) Observamos que os casos com imunofenótipos luminal A (total de 51 casos) e Triplo negativo (TN = total de 30 casos, incluindo os basalóides) são os mais frequentes entre os casos avaliáveis.

A Tabela acima demonstra que 95 casos foram avaliáveis na associação entre a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 e a distribuição das amostras CDI (TMAs 2 e 3), segundo o imunofenótipo molecular (luminal A, luminal B, HER2 e TN), sem significância estatística. Destes, 43 casos (45%) tiveram a expressão imunoistoquímica citoplasmática de GRB10 positiva e em 52 casos (55%), a expressão foi negativa. Observamos um predomínio de casos com imunofenótipo luminal A e TN nos grupos de casos GRB10 positivo e GRB10 negativo. Quando GRB10 foi negativo, 33 casos (63%) apresentaram imunofenótipo luminal A.

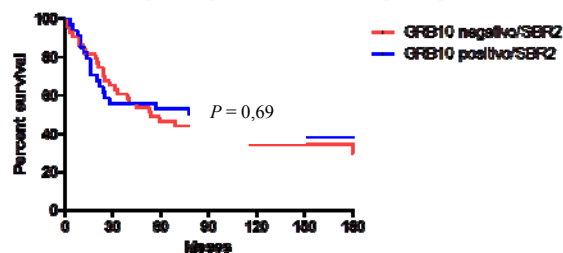
Anexo 15 - Associação entre expressão imunohistoquímica de GRB10 e sobrevida livre de doença e global com as características clinicopatológicas

A) GRB10 e Grau de SBR

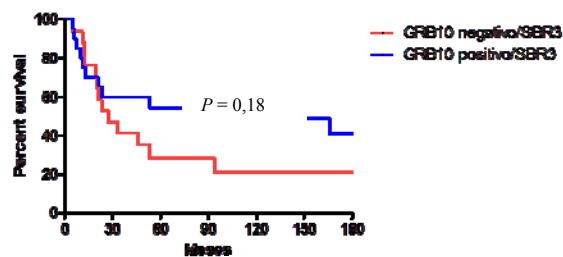
Sobrevida livre de doença -citoplasma SBR 1-categorização 4



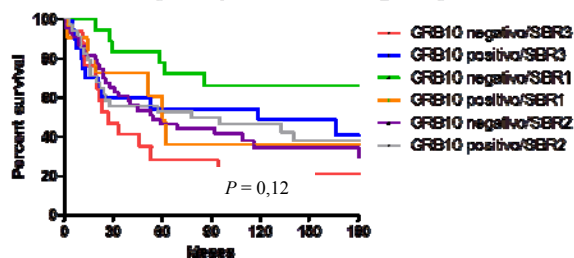
Sobrevida livre de doença -citoplasma SBR 2 -categorização 4



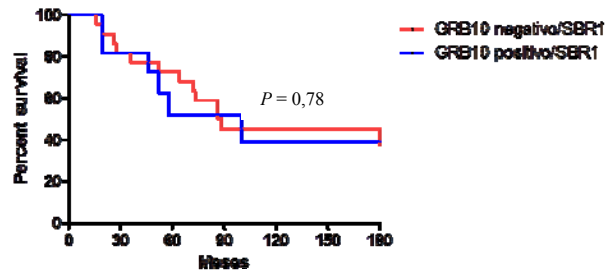
Sobrevida livre de doença -citoplasma SBR 3 -categorização 4



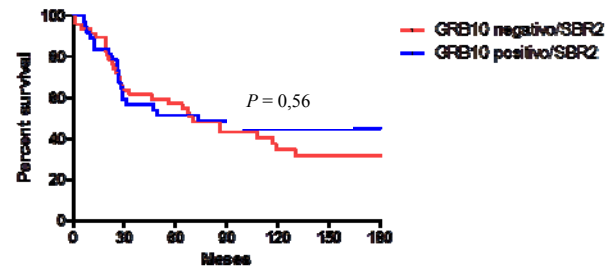
Sobrevida livre de doença -citoplasma SBR -categorização 4



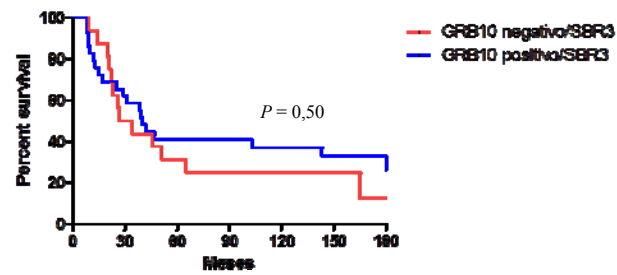
Sobrevida global -citoplasma SBR 1-categorização 4



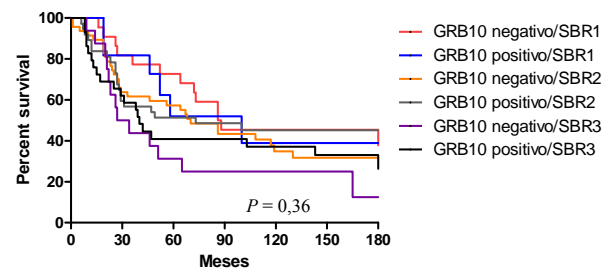
Sobrevida global -citoplasma SBR 2 -categorização 4



Sobrevida global -citoplasma SBR 3 -categorização 4

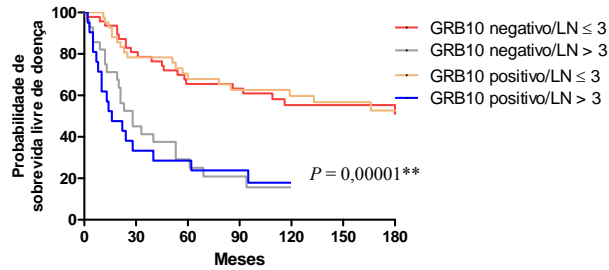


Sobrevida global -citoplasma SBR-categorização 4

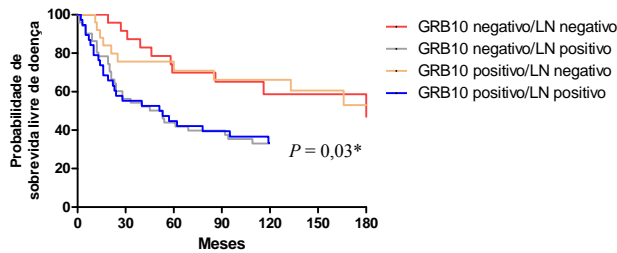


B) GRB10 e comprometimento de linfonodos

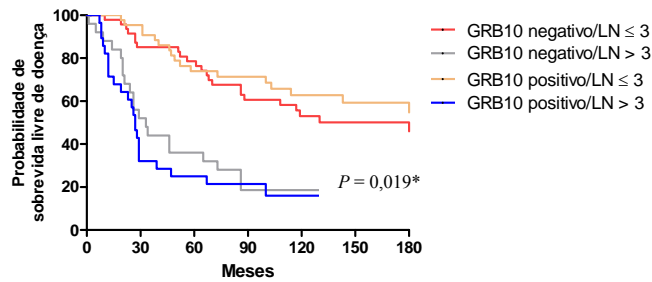
Sobrevida livre de doença GRB10 citoplasma-status linfonodo-categorização 4



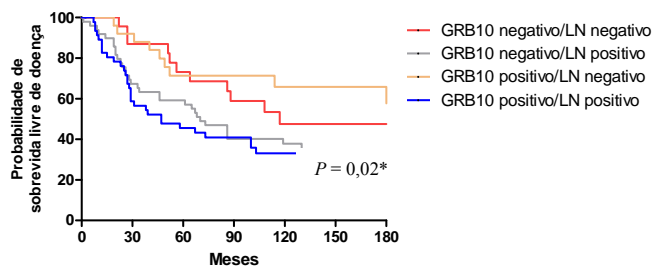
Sobrevida livre de doença GRB10 citoplasma-status linfonodo-categorização 4



Sobrevida global GRB10 citoplasma-status linfonodo-categorização 4



Sobrevida global GRB10 citoplasma-status linfonodo-categorização 4



Gráficos A e B: Curvas de Kaplan-Meier para cálculo de sobrevida. (A), sobrevida livre de doença e sobrevida global com grau histológico de SBR. (B), sobrevida livre de doença e sobrevida global com o *status* linfonodal. No eixo X, são mostrados os meses de seguimento e no eixo y a probabilidade de sobrevida global e livre de doença. (Expressão citoplasmática de GRB10 - Categorização 4, conforme descrito em materiais e métodos, item 3.11.1). **Legenda:** (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$.

Não foram observadas associações com significância estatística, tanto para a sobrevida global, quanto para a sobrevida livre de doença, entre a expressão imunistoquímica citoplasmática de GRB10 (Categorização 4, conforme descrito em materiais e métodos, item 3.11.1) e o grau histológico de CDI.

Observamos associações com significância estatística [(*) $P < 0.05$ e (**) $P < 0,01$], tanto para a sobrevida global, quanto para a sobrevida livre de doença, entre a expressão imunistoquímica citoplasmática de GRB10 (Categorização 4, conforme descrito em materiais e métodos, item 3.11.1) e o *status* linfonodal. No entanto, observamos a maior robustez do *status* linfonodal em relação à expressão de GRB10, já que a maior sobrevida está mais associada à linfonodo negativo ou ≤ 3 linfonodos comprometidos, independente da expressão imunistoquímica de GRB10.