

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE  
MEMBROS DA FAMÍLIA HOX NO CÂNCER  
DE MAMA LUMINAL**

**FÁBIO MEDEIROS DE AZEVEDO**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade  
Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Azevedo, Fábio Medeiros de  
**Expressão gênica e proteica de membros da família HOX no câncer de mama luminal** / Fábio Medeiros de Azevedo - São Paulo, 2019.  
107p.  
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.  
Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Carcinoma in Situ/Carcinoma in Situ. 3. Genes Homeobox/Genes, Homeobox. 4. Expressão Gênica/Gene Expression. 5. Diferenciação Celular/Cell Differentiation. 6. Genes Reguladores/Genes, Regulator. 7. Estudos Retrospectivos/Retrospective Studies.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que nos dá a oportunidade de virmos ao mundo para fazermos deste um lugar melhor.

Aos meus pais, Flávio e Fátima, sempre presentes da melhor forma possível para superar todas as minhas dificuldades.

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus sinceros e eternos agradecimentos aos doutores Fernando Soares e Victor Andrade, exemplos de profissionais e amigos, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender muitos dos maiores ensinamentos de minha vida.

Aos colegas patologistas, residentes e técnicos que prestaram fundamental auxílio na elaboração desse trabalho, toda a minha gratidão.

## RESUMO

Azevedo FM. **Expressão gênica e proteica de membros da família HOX no câncer de mama luminal**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os genes homeobox são fatores de transcrição que regulam a expressão de múltiplos genes que influenciam o crescimento celular e fazem a mediação entre o epitélio e o estroma, regulando a diferenciação específica de cada tecido. Sua expressão é comumente desregulada em tumores, e estudos indicam que estes genes atuam como oncogenes, promovendo crescimento celular e invasão, ou como supressores tumorais, devido à sua atuação nos processos de morfogênese. No caso do câncer de mama, alguns genes homeobox tem expressão aumentada e outros, reduzida, e em geral não há ocorrência de mutações. **Objetivos:** Este trabalho procurou estudar a expressão de membros da família HOX em carcinomas luminais da mama, e correlacionar essa expressão com características clínico-patológicas, sobrevida global e livre de doença; avaliar a correlação entre a expressão de HOXA1 e Receptor de Progesterona; avaliar a correlação da expressão de HOXB7 e de MYC, bem como comparar os resultados da expressão gênica por imunohistoquímica e RT-qPCR. **Métodos:** Foram selecionados 260 pacientes com Carcinoma Mamário Luminal (CML) diagnosticados entre 2007 e 2010, 29 pacientes com amostras de CML congelados no Biobanco do AC Camargo Cancer Center, todos pareados com as respectivas amostras para imunohistoquímica, e 4 casos de tecido mamário normal congelado oriundos das pacientes doadoras de amostras de tumor congeladas. A expressão gênica foi pesquisada através dos métodos de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. A técnica imunohistoquímica e os ensaios de expressão gênica foram realizados para os genes *HOXA1*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXB9*, *HOXB13*, *HOXC13* e *HOXD3*. Para a técnica de

imunohistoquímica, o número de células positivas foi quantificado para cada marcador através do sistema de morfometria e escaneamento de lâminas Aperio ScanScope XT. A quantificação relativa de expressão gênica, na técnica de RT-qPCR foi realizada utilizando o software Sequence Detection System (Applied Biosystems), e calculada pelo modelo matemático descrito por Pfaffl. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando os softwares Excel (Microsoft 2011) e IBM SPSS, versão 24. **Resultados:** Houve associação com entre a expressão de HOXB7 e estadiamento patológico T ao diagnóstico ( $p=0,015$ ) e entre a expressão de HOXC13 e estadiamento N ao diagnóstico ( $p=0,002$ ;  $OR=2,61$ ). Aumento da expressão de HOXA9 foi associado com redução da sobrevida global ( $p=0,031$ ;  $RR: 2,331$ ,  $IC95\% [1,054-5,157]$ ,  $P=0,037$ ). Não houve associação entre a expressão de HOXA1 e Receptor de Progesterona e/ou entre a expressão de HOXB7 e MYC. A correlação entre a expressão gênica por imunohistoquímica e RT-qPCR foi inexistente, negativa fraca ou positiva muito fraca. **Conclusões:** Aumento da expressão de HOXB7 é associado com pior estadiamento patológico T ao diagnóstico. Aumento da expressão de HOXC13 é associado com maior ocorrência de metástases linfonodais. Aumento da expressão de HOXA9 reduz a sobrevida global.

**Descritores:** Neoplasias da Mama. Carcinoma *in Situ*. Genes Homeobox. Expressão Gênica. Diferenciação Celular. Genes Reguladores. Estudos Retrospectivos.

## SUMMARY

Azevedo FM. **[Gene and protein expression of HOX family members in luminal breast cancer]**. São Paulo, 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Homeobox genes are transcription factors that regulate the expression of multiple genes which affect cell growth and make the mediation between the epithelium and the stroma, so regulating the differentiation of each specific tissue. Its expression is commonly deregulated in tumors, and studies indicate that these genes act as oncogenes, promoting cell growth and invasion, or act as tumor suppressors genes, due to its role in morphogenesis processes. In breast cancer, homeobox genes can have their increased or decreased expression, and generally there are no occurrence of mutations. **Objectives:** This work aimed to study the expression of HOX family members in luminal carcinomas of the breast and to correlate this expression with clinical-pathological characteristics, global and disease-free survival; to evaluate the correlation between the expression of HOXA1 and Progesterone Receptor; to evaluate the correlation of HOXB7 and MYC expression, as well as to compare the results of the gene expression by immunohistochemistry and RT-qPCR. **Methods:** We selected 260 patients with Luminal Mammary Carcinoma (CML) diagnosed between 2007 and 2010, 29 patients with frozen CML samples in the AC Camargo Cancer Center Biobank, all paired with the respective samples for immunohistochemistry, and 4 cases of normal breast tissue frozen from donor patients with frozen tumor samples. Gene expression was investigated through the immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction in real time. Immunohistochemical technique and gene expression assays were performed for the genes HOXA1, HOXA5, HOXA9, HOXB7, HOXB9, HOXB13, HOXC13 and HOXD3. For the immunohistochemical technique, the number of positive cells was quantified

for each marker through the morphometry and scanning system of Aperio ScanScope XT slides. The relative quantification of gene expression in the RT-qPCR technique was performed using the Sequence Detection System (Applied Biosystems) software, and calculated by the mathematical model described by Pfaffl. **Results:** There was an association between the expression of HOXB7 and pathological staging T at the diagnosis ( $p = 0.015$ ) and between the expression of HOXC13 and staging N at diagnosis ( $p = 0.002$ , OR = 2.61). Increased expression of HOXA9 was associated with a reduction in overall survival ( $p = 0.031$ , RR = 2.331, 95% CI [1.054-5.157],  $P = 0.037$ ). There was no association between the expression of HOXA1 and Progesterone Receptor and / or between the expression of HOXB7 and MYC. The correlation between the gene expression by immunohistochemistry and RT-qPCR was non-existent, negative negative or very weak positive. **Conclusions:** Increased expression of HOXB7 is associated with poorer T staging at diagnosis. Increased expression of HOXB13 is associated with increased occurrence of lymph node metastases. Increased expression of HOXA9 reduces overall survival.

**Key-words:** Breast Neoplasms. Carcinoma in Situ. Genes, Homeobox. Gene Expression. Cell Differentiation. Genes, Regulator. Retrospective Studies.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estimativa da incidência de câncer de mama feminina em todo o mundo, por 100.000 mulheres, para o ano de 2018 .....	2
<b>Figura 2</b>	Evolução temporal das taxas de incidência do câncer de mama feminina, ajustadas por idade, em países selecionados, no período de 1993 a 2013.....	3
<b>Figura 3</b>	Representação espacial das taxas brutas de incidência do cancer de mama feminina, por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação .....	4
<b>Figura 4</b>	Estimativa da taxa de mortalidade por câncer de mama feminina em todo o mundo, por 100.000 mulheres, para o ano de 2018 .....	5
<b>Figura 5</b>	Tendência de mortalidade por câncer de mama feminina em todo o mundo, por 100.000 mulheres, ajustada por idade, entre os anos de 1980 e 2013, em países selecionados .....	6
<b>Figura 6</b>	Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes em 2012, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 mulheres, Brasil, entre 1982 e 2012.....	7
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática do homeodomínio e da ligação ao DNA .....	22
<b>Figura 8</b>	Mutações <i>Antennapedia</i> e <i>Bithorax</i> .....	22
<b>Figura 9</b>	Estrutura do gene homeobox e da homeoproteína .....	24

<b>Figura 10</b>	Localização dos HOX genes em humanos e semelhança funcional com HOM-C de Drosophila .....	27
<b>Figura 11</b>	Expressão aberrante de HOX genes em alguns tumores sólidos humanos.....	32
<b>Figura 12</b>	Curvas de sobrevida global e livre de doença da amostra selecionada.....	63
<b>Figura 13</b>	Expressão dos HOX genes por RT-qPCR em amostras de câncer de mama .....	64
<b>Figura 14</b>	Variações na expressão dos genes HOXA1 (A e B), HOXA5 (C e D) e HOXA9 (E e F) em diferentes tumores .....	65
<b>Figura 15</b>	Variações na expressão dos genes HOXB7 (A e B), HOXB9 (C e D) e HOXB13 (E e F) em diferentes tumores .....	65
<b>Figura 16</b>	Variações na expressão dos genes HOXC13 (A e B), HOXD3 (C e D) e MYC (E e F) em diferentes tumores .....	66
<b>Figura 17</b>	Curvas de sobrevida global de acordo com a intensidade da expressão por imunohistoquímica dos genes Homeobox estudados .....	68
<b>Figura 18</b>	Curvas de sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade da expressão por imunohistoquímica dos genes Homeobox.....	69
<b>Figura 19</b>	Distribuição da expressão de HOXA1 em relação à expressão do receptor de progesterona.....	70
<b>Figura 20</b>	Distribuição da expressão de HOXB7 em relação à expressão	71

do MYC .....

**Figura 21** Correlação da expressão gênica por imunohistoquímica e RT-qPCR..... 73

**Figura 22** Sobrevida livre de doença de HOXB7 ..... 87

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Tendências de mortalidade por câncer de mama feminina, entre os anos de 1980 e 2009, no Brasil e em suas macrorregiões .....	8
<b>Tabela 2</b>	Características clínico-patológicas das pacientes selecionadas .....	61
<b>Tabela 3</b>	Características clínico-patológicas das pacientes doadoras das amostras de tumor congelado.....	62
<b>Tabela 4</b>	Correlação da expressão dos HOX genes com características clínicas e tumorais .....	67
<b>Tabela 5</b>	Correlação entre a expressão de HOXA1 e do Receptor de Progesterona.....	70
<b>Tabela 6</b>	Correlação entre a expressão de HOXB7 e de MYC .....	71
<b>Tabela 7</b>	Distribuição do status genético dos HOX genes avaliados por RT-qPCR.....	77
<b>Quadro 1</b>	Estratégias de rastreamento do câncer de mama, de acordo com diferentes órgãos, em diferentes países .....	13
<b>Quadro 2</b>	Alguns exemplos de mecanismos genéticos associados à tumorigênese dos HOX genes .....	30
<b>Quadro 3</b>	Alterações dos HOX genes em diferentes tumores sólidos.....	39
<b>Quadro 4</b>	Padronização dos anticorpos dos genes HOX .....	52

<b>Quadro 5</b>	Padrões de positividade dos anticorpos dos genes HOX.....	54
<b>Quadro 6</b>	Lista dos ensaios utilizados para a análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.....	57

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CMIL</b>	Carcinoma Mamário Invasivo Luminal
<b>CDIS</b>	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
<b>ER</b>	Receptor de Estrogênio
<b>ESMO</b>	European Society of Medical Oncology
<b>HOM-C</b>	Complexo Homeótico
<b>HOX</b>	Homeobox
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>JSMO</b>	Japanese Society of Medical Oncology
<b>NCCN</b>	National Comprehensive Cancer Network
<b>RT-qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
<b>TMA</b>	Tissue Microarray
<b>UICC</b>	Union for International Cancer Control

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	O Câncer de Mama .....	1
1.1.1	Epidemiologia .....	1
1.1.1.1	Incidência do câncer de mama .....	1
1.1.1.2	Mortalidade por câncer de mama.....	5
1.1.1.3	Mortalidade por câncer de mama.....	9
1.1.2	Rastreamento do câncer de mama .....	11
1.1.3	Diagnóstico do câncer de mama .....	14
1.1.4	Estadiamento do câncer de mama .....	15
1.1.5	Tratamento do câncer de mama.....	16
1.1.6	Classificação molecular do câncer de mama .....	17
1.2	Genes Homeobox.....	21
1.2.1	Definição e histórico .....	21
1.2.2	Estrutura dos genes homeobox.....	23
1.2.3	Classificação dos genes homeobox .....	24
1.2.4	HOX genes e embriogênese .....	25
1.2.5	HOX genes na vida adulta.....	28
1.2.6	HOX genes, oncogênese e neoplasias .....	29
1.3	HOX genes e câncer de mama .....	40
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
3.1	Objetivo Geral.....	47
3.2	Objetivos Específicos .....	47
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	Casuística.....	49
4.1.1	Carcinomas mamários invasivos luminiais .....	49

4.1.2	Critérios de inclusão .....	49
4.1.3	Critérios de exclusão .....	50
4.1.4	Características das pacientes.....	50
4.1.5	Características das neoplasias.....	50
4.2	Microarranjos teciduais.....	51
4.3	Imunohistoquímica .....	52
4.4	Análise por morfometria.....	53
4.5	RT-qPCR.....	55
4.5.1	Extração do RNA.....	55
4.5.2	Tratamento das amostras com DNase.....	55
4.5.3	Análise de expressão gênica.....	56
4.5.3.1	Síntese do cDNA.....	56
4.5.3.2	Amplificação do cDNA e análise da expressão gênica .....	56
4.6	Análise estatística.....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
5.1	Características clínico-patológicas .....	60
5.2	Expressão gênica por RT-qPCR .....	63
5.3	Expressão gênica por imunohistoquímica .....	64
5.3.1	Expressão dos HOX genes e correlação clínico-patológica .....	66
5.3.2	Expressão dos HOX genes e sobrevida.....	66
5.3.3	Correlação da expressão de HOXA1 e Receptor de Progesterona... 70	
5.3.4	Correlação da expressão de HOXB7 e MYC.....	71
5.4	Correlação da expressão gênica por RT-qPCR e Imunohistoquímica .....	72
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
6.1	Características clínico-patológicas .....	76
6.2	Expressão gênica por RT-qPCR .....	76
6.3	Expressão gênica por imunohistoquímica .....	79
6.3.1	Expressão dos HOX genes e correlação clínico-patológica .....	80
6.3.2	Expressão dos HOX genes e sobrevida.....	84

6.3.3	Correlação da expressão de HOXA1 e Receptor de Progesterona...	90
6.3.4	Correlação da expressão de HOXB7 e MYC.....	91
6.4	Correlação da expressão gênica por RT-qPCR e Imunohistoquímica .....	92
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>98</b>

### **ANEXOS**

- Anexo 1** Estadiamento do câncer de mama
- Anexo 2** Quantificação do RNA extraído dos tecidos congelados
- Anexo 3** Parecer Consubstanciado do CEP

### **APÊNDICE**

- Apêndice 1** Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

# **1 INTRODUÇÃO**

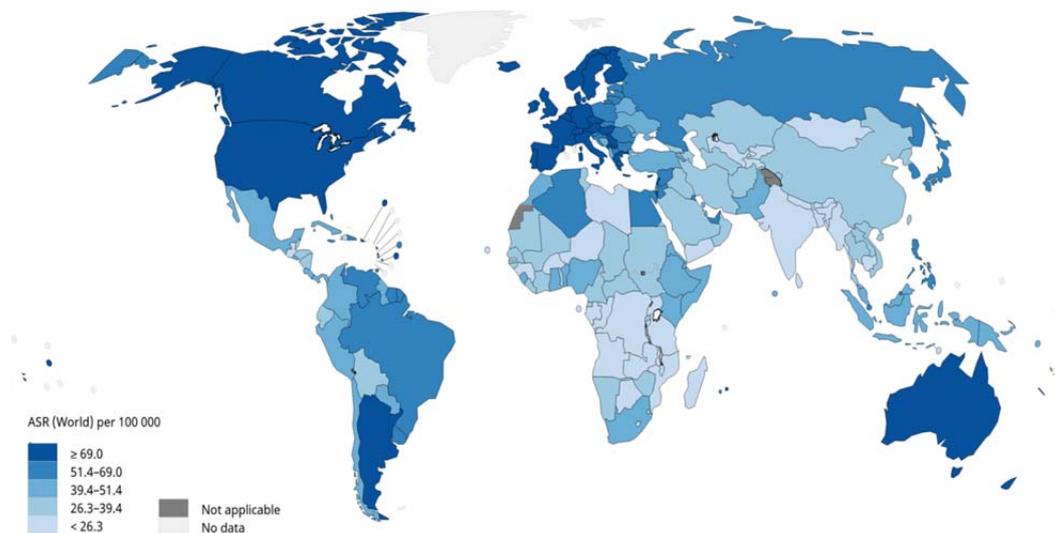
## **1.1 O CÂNCER DE MAMA**

### **1.1.1 Epidemiologia**

#### **1.1.1.1 Incidência do câncer de mama**

Para o ano de 2018, excluindo-se o câncer de pele não melanoma, são estimados 17 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo (2.088.849 casos), ligeiramente atrás das neoplasias pulmonares (2.093.876 casos), e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a 24,2% de todos os casos de câncer no sexo feminino. A previsão de incidência mundial para o ano de 2018 do câncer de mama foi de 2,088 milhões de novos casos, sendo a taxa de incidência variável entre as regiões do mundo: é maior na Austrália e na Nova Zelândia (94,2/100.000) Europa Ocidental (92,6/100.000) e menor na África Média (27,9/100.000) e no Centro-Sul da Ásia (25,9/100.000) (BRAY et al., 2018). As diferentes taxas de incidência do câncer de mama, observadas entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, refletem principalmente a qualidade do sistema de saúde e as diferentes características do perfil populacional: nos países desenvolvidos, a disponibilidade dos métodos para o diagnóstico precoce do câncer de mama é mais ampla em todo o seu território, e a população goza de melhores condições de acesso a tais métodos, além de apresentar mais

fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, relacionados à fatores reprodutivos, nutricionais, menstruais e antropométricos, explicando assim as taxas de incidência mais elevadas nessas regiões. A Figura 1 corresponde ao mapa da incidência de câncer de mama em todo o mundo, estimada para o ano de 2018.

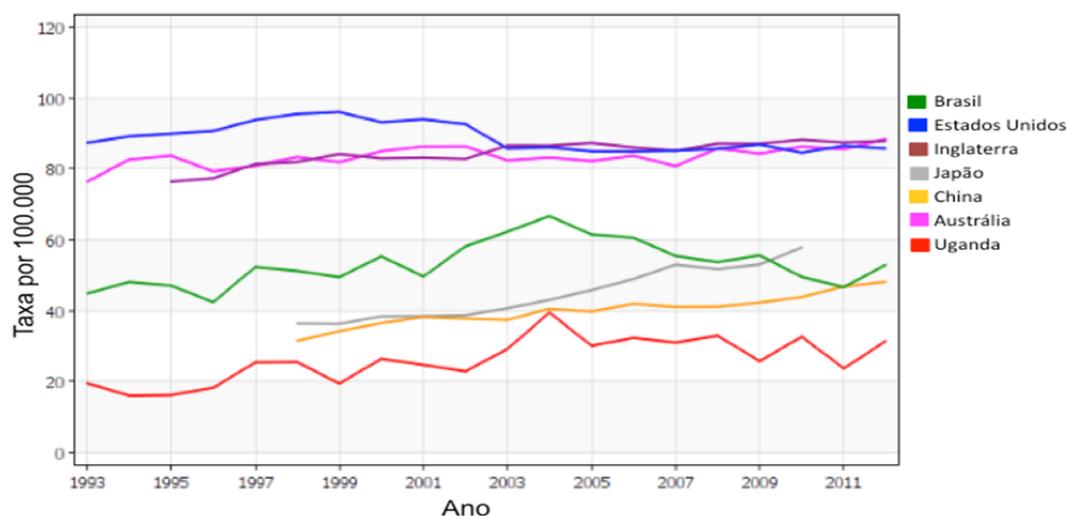


**Fonte:** International Agency for Research on Cancer-IARC (2018).

**Figura 1** – Estimativa da incidência de câncer de mama feminina em todo o mundo, por 100.000 mulheres, para o ano de 2018.

Observa-se, ao longo do tempo, uma tendência de aumento nas taxas de incidência do câncer de mama em países em desenvolvimento, explicada por melhora nas condições sócio-econômicas e alterações dos hábitos de vida das populações desses países, por exemplo: postergamento da primeira gravidez, redução do número de parturições, obesidade e sedentarismo e maior disponibilidade de métodos diagnósticos. Em contrapartida, observa-se uma tendência de redução nas taxas de incidência

do câncer de mama nos países desenvolvidos, em parte explicada pela menor utilização de terapia de reposição hormonal pós-menopausa a partir do início do século XXI. A Figura 2 revela a tendência nas taxas de incidência do câncer de mama ao longo de 20 anos.

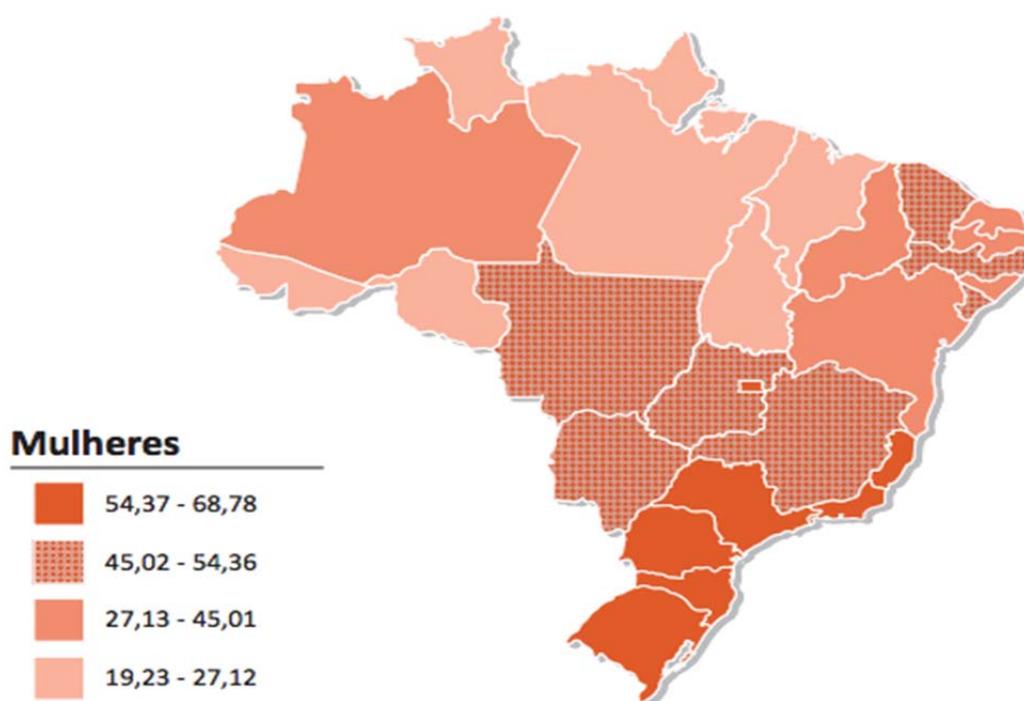


Fonte: IARC (2018).

**Figura 2** – Evolução temporal das taxas de incidência do câncer de mama feminino, ajustadas por idade, em países selecionados, no período de 1993 a 2013.

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para cada ano do biênio 2018-2019 é de 600.000 novos casos de câncer, incluindo o câncer de pele não-melanoma, sendo 310.300 novos casos para o sexo feminino. Temos um número estimado de 59.700 novos casos de câncer de mama feminina para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 por 100.000 mulheres (Ministério da Saúde, 2018).

As taxas de incidência do câncer de mama continuam elevadas devido ao diagnóstico tardio da doença. A distribuição desses novos casos, segundo a localização geográfica, mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país, sendo que nas regiões Sudeste (69,5/100 mil), Sul (73,07/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil), o câncer de mama feminina será o mais incidente, e na região Norte, o câncer de mama é o segundo mais frequente entre as mulheres, com aproximadamente 19,21 novos casos a cada 100 mil mulheres, superado pelo câncer de colo uterino nesta região (Ministério da Saúde, 2018). Na Figura 3 podemos observar o mapa das taxas de incidência do câncer de mama feminina no Brasil.

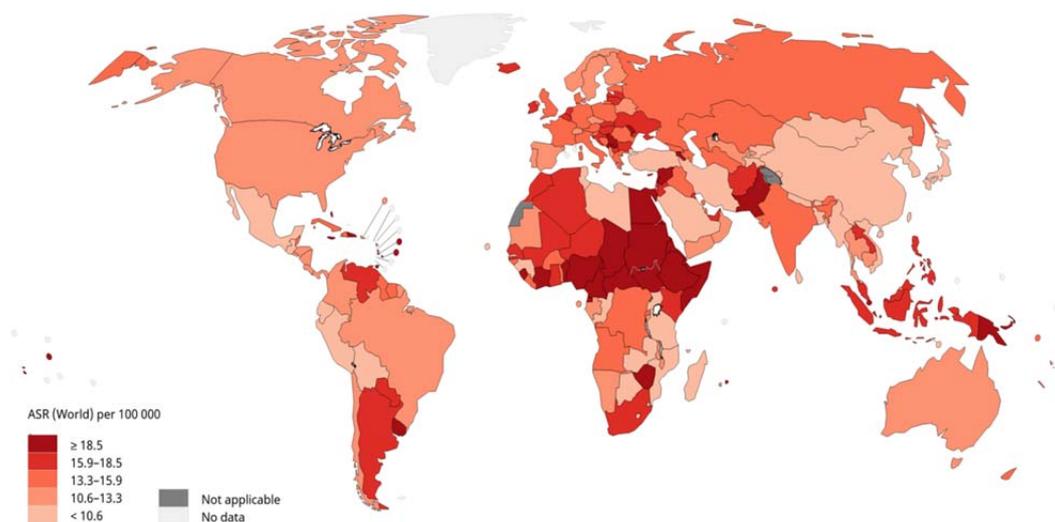


**Fonte:** Ministério da Saúde (2018).

**Figura 3** – Representação espacial das taxas brutas de incidência do cancer de mama feminina, por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação.

### 1.1.1.2 Mortalidade por câncer de mama

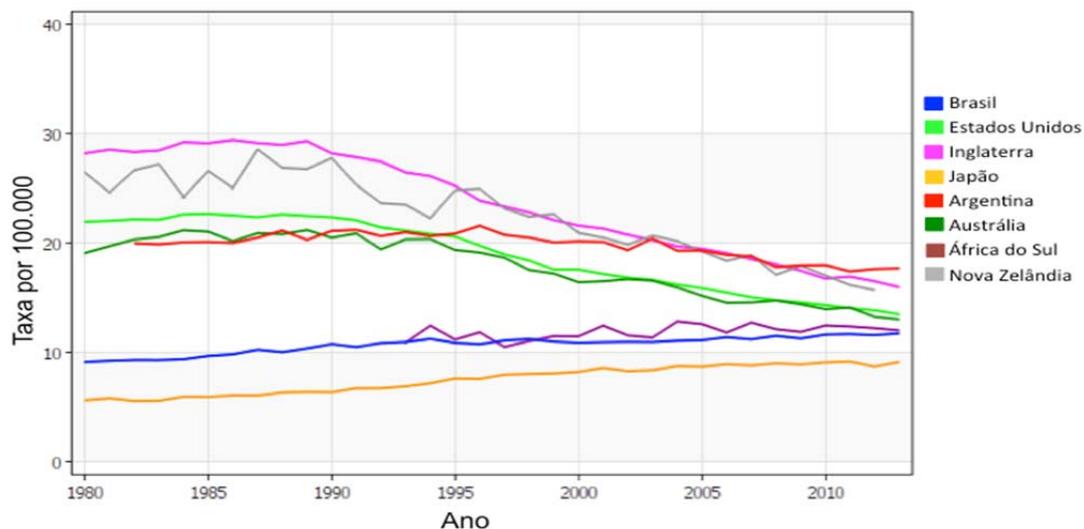
Ainda para o ano de 2018, o número estimado de óbitos por câncer em todo o mundo é de 9,5 milhões. Destas, 626.679 mil mortes serão atribuídas ao câncer de mama, sendo a segunda causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres nos países desenvolvidos, apenas superada pelo câncer de pulmão, e a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres nos países em desenvolvimento. O câncer de mama corresponde a 6,6% do total de mortes por câncer entre as mulheres em todo o mundo (BRAY et al. 2018). A Figura 4 representa as taxas de mortalidade por câncer de mama em todo o mundo.



**Fonte:** IARC (2018).

**Figura 4** – Estimativa da taxa de mortalidade por câncer de mama feminina em todo o mundo, por 100.000 mulheres, para o ano de 2018.

Nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade vem diminuindo nas últimas décadas, e atualmente a sobrevida em 5 anos é de 85%, valor acima daquele observado nos países em desenvolvimento, cuja taxa de sobrevida em 5 anos para o câncer de mama apresenta valores entre 50 e 60% (TORRE et al. 2015). Essas diferenças em relação às taxas de mortalidade e sobrevida são explicadas por diagnóstico mais precoce e avanços na terapêutica do câncer de mama nos países desenvolvidos. Na Figura 5, observamos a evolução temporal da tendência de mortalidade por câncer de mama em diferentes países, desenvolvidos e em desenvolvimento, ao longo de 33 anos, padronizadas por idade.

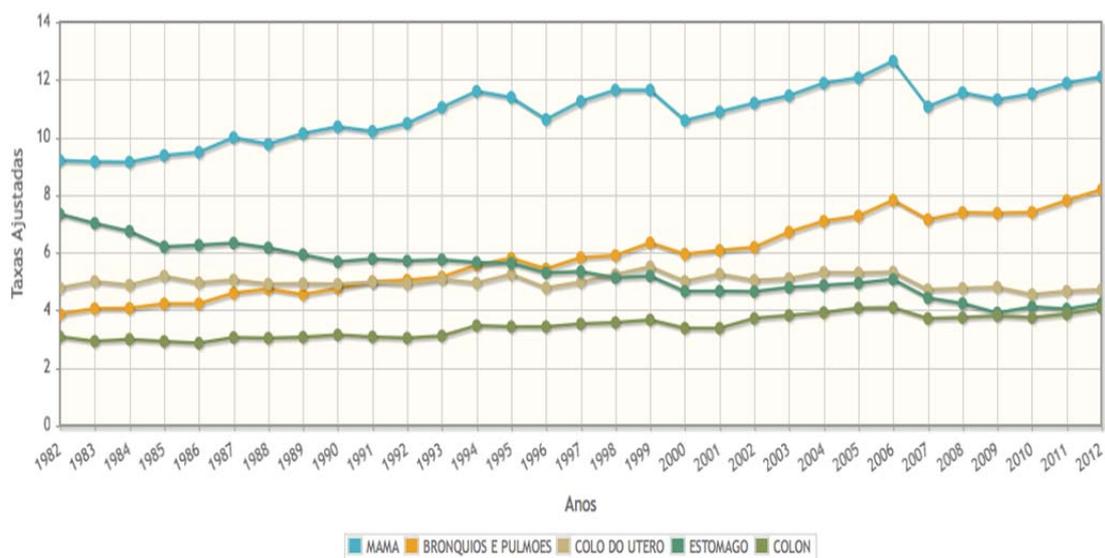


Fonte: IARC (2018).

**Figura 5** – Tendência de mortalidade por câncer de mama feminina em todo o mundo, por 100.000 mulheres, ajustada por idade, entre os anos de 1980 e 2013, em países selecionados.

O Brasil vem apresentando, ao longo dos últimos 30 anos, um aumento na taxa de mortalidade por câncer de mama feminina, como podemos observar na Figura 6. A taxa de mortalidade por câncer de mama

padronizada para o Brasil, em 1982, era de 9,20 por 100.000 mulheres, e em 2012, 12,10 por 100.000 mulheres. A tendência de mortalidade por câncer de mama feminina no Brasil e em suas macrorregiões, a partir de meados da década de 1990, apresenta uma tendência à estabilização: antes desse período, havia um incremento anual de 1,6% no aumento da taxa de mortalidade por câncer de mama, e após esse período, o incremento anual passou a ser de 0,4% (FREITAS JUNIOR et al. 2012), o que reflete avanços no tratamento da doença e expansão da estratégia de diagnóstico precoce da doença através da utilização da mamografia, mais disponibilizados a partir desse período.



Fonte: Ministério da Saúde (2014).

**Figura 6** – Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes em 2012, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 mulheres, Brasil, entre 1982 e 2012.

**Tabela 1** – Tendências de mortalidade por câncer de mama feminina, entre os anos de 1980 e 2009, no Brasil e em suas macrorregiões.

Brasil e suas macrorregiões	Tendência 1						Tendência 1					
	Período		Taxa Mortalidade				Período		Taxa Mortalidade			
	Inicial	Final	Inicial	Final	APC	(95% CI; p-value)	Inicial	Final	Inicial	Final	APC	(95% CI; p-value)
Brasil	1980	1994	9,2	11,7	1,6*	(1,1-2,1;p<0,01)	1994	2009	11,7	11,3	0,4	(-0,1-0,8;p=0,08)
Sul	1980	1994	10,9	14,4	2,2*	(1,5-3,0;p<0,01)	1994	2009	14,4	12,7	-0,3	(-1,0-0,3;p=0,31)
Sudeste	1980	1997	12,3	14,6	1,2*	(0,8-1,6;p<0,01)	1997	2009	14,6	12,6	-0,9*	(-1,6-0,2;p<0,01)
Centro-Oeste	1980	2009	5,3	10,4	1,9*	(1,5-2,4;p<0,01)						
Norte	1980	2009	4,1	6,6	2,4*	(1,9-3,0;p<0,01)						
Nordeste	1980	2000	4,2	6,1	2,1*	(1,7-2,5;p<0,01)	2000	2009	6,1	9,0	5,3*	(3,9-6,7;p<0,01)

Taxa de mortalidade padronizada por 100.000 mulheres

\*Estatisticamente significante;  $p < 0,05$

**Fonte:** FREITAS-JÚNIOR et al. (2012)

Um outro fato importante em relação às taxas de mortalidade por câncer de mama feminina no Brasil é a discrepância existente entre diferentes áreas urbanas e entre áreas urbanas e rurais do país. Nos centros urbanos da região Sudeste do país, as taxas de mortalidade por câncer de mama são quase vinte vezes mais baixas que aquelas dos centros urbanos da região Norte (GONZAGA et al. 2014). Esses dados refletem as diferenças sócio-econômicas que existem entre as diferentes regiões urbanas do país: regiões nas quais a população tem melhores condições sócio-econômicas tem uma taxa de mortalidade por câncer de mama feminina mais baixa. E na maior parte dos Estados brasileiros, observa-se uma taxa de mortalidade três vezes menor nas áreas rurais em relação aos centros urbanos. Uma possível explicação para esse fato é a maior exposição aos fatores de proteção pelas mulheres residentes nas áreas rurais: multiparidade, amamentação e primeira gestação em idade mais jovem.

### 1.1.1.3 Fatores de risco para o câncer de mama

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são sexo e idade, com maior prevalência (99% dos casos), incidência e mortalidade no sexo feminino e aumento do risco com aumento da idade. Uma mulher que vive nos Estados Unidos tem um risco de 12,4% de ser diagnosticada com câncer de mama durante toda sua vida. No mesmo país, uma mulher de 50 anos tem um risco de 2,3% de ser diagnosticada com câncer de mama nos próximos 10 anos, ao passo que mulheres com 30 e 40 anos tem um risco de 0,5% e 1,5%, respectivamente, de desenvolver câncer de mama nos próximos 10 anos (DESANTIS et al. 2017).

Juntamente com sexo e idade, podemos listar outros fatores ditos constitutivos, ou seja, inerentes ao indivíduo, que são associados ao aumento no risco de desenvolvimento do câncer de mama: história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, explicado principalmente pela disfunção genética dos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2, etnia caucasiana e presença de lesões proliferativas na mama com atipia (KAMINSKA et al. 2015).

Obesidade, dieta rica em gordura, sedentarismo e consumo de álcool, características associadas aos hábitos de vida, aumentam o risco relativo de desenvolvimento do câncer de mama (KAMINSKA et al. 2015).

Fatores hormonais que aumentam a exposição ao estrogênio, com sinergia da progesterona, tais como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e postergamento da primeira gestação, e também uso de contraceptivos orais ou de terapia de reposição hormonal combinada na

pós-menopausa, são altamente associados ao aumento do risco de desenvolvimento da neoplasia de mama.

Em contrapartida, alguns fatores sabidamente são associados à redução do risco relativo de desenvolvimento do câncer de mama: menarca tardia, menopausa precoce, dieta rica em anti-oxidantes, prática de atividade física, primeira gestação em idade mais jovem, multiparidade e amamentação (ANDERSON et al. 2014).

No que se refere aos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama, ANDERSON et al. (2014) estudaram a associação entre fatores reprodutivos e subtipos moleculares do câncer de mama. Em se tratando de tumores positivos para receptores hormonais, os autores encontraram forte associação com nuliparidade, uso de terapia de reposição hormonal e maior intervalo entre a idade da menarca e da primeira gestação, também associação com idade avançada da primeira gravidez e menarca precoce, e associação menos consistente com redução do período de amamentação, menopausa tardia e uso de contraceptivos orais. Tumores triplo negativos foram associados com redução do período de lactação e menos consistentemente com aumento da parturição, idade mais jovem da primeira gestação e uso de contraceptivos orais. Muito poucos estudos revelaram associação envolvendo tumores com hiperexpressão de HER2 e parturição, amamentação, uso de contraceptivos orais ou de terapia de reposição hormonal e idade da menarca, menopausa e da primeira gestação.

### 1.1.2 Rastreamento do câncer de mama

A população de risco padrão para o desenvolvimento do câncer de mama é constituída por mulheres assintomáticas da mesma faixa etária, ou seja, sendo considerados apenas idade e sexo como parâmetros norteadores das estratégias de rastreamento. Já a população de alto risco para desenvolvimento do câncer de mama é constituída por indivíduos que apresentam muitos fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Para essa população, as estratégias de rastreamento são iniciadas em idade mais precoce em relação aos indivíduos da população padrão, além da utilização de outros métodos diagnósticos.

Os principais métodos de rastreamento utilizados para o diagnóstico do câncer de mama em sua fase pré-clínica são os exames de imagem mamografia e ressonância magnética. Não há na literatura evidências atuais que recomendem o uso rotineiro de outros métodos diagnósticos no rastreamento do câncer de mama, tais como ultrassonografia, cintilografia mamária ou lavagem ductal. Tais exames podem ser usados apenas em situações específicas.

Para fins de rastreamento ou diagnóstico do câncer de mama, deve-se partir da anamnese e do exame físico da paciente a ser avaliada. Caso a anamnese não revele a presença de fatores de risco e/ou sintomatologia relacionados ao câncer de mama e não sejam detectadas anormalidades mamárias durante o exame físico, procede-se à estratégia de rastreamento do câncer de mama. Pacientes com alto risco para desenvolvimento do câncer de mama ou com presença de anormalidades mamárias ao exame

físico devem ser incluídas em estratégias de rastreamento específico e/ou submetidas a procedimentos diagnósticos.

Em todo o mundo, muito se discute sobre os riscos e benefícios das estratégias de rastreamento do câncer de mama através do uso da mamografia, notadamente em relação à periodicidade da realização do exame e em quais faixas etárias deve ser realizado. Sociedades de especialistas e órgãos de controle das políticas de saúde de diferentes países divergem quanto às recomendações de periodicidade e faixa etária de realização do exame mamográfico, ou existem divergências entre sociedades de especialistas e órgãos de controle da saúde em um mesmo país.

O Quadro 1 demonstra as recomendações para estratégia de rastreamento do câncer de mama para a população de risco padrão em diferentes países.

**Quadro 1:** Estratégias de rastreamento do câncer de mama, de acordo com diferentes órgãos, em diferentes países

Organização e ano da recomendação	Recomendação
Norwegian Breast Cancer Screening Program (Noruega), 2010	Mamografia a cada 2 anos para mulheres com idade de 47 a 73 anos
US Preventive Services Task Force (Estados Unidos), 2009	Mamografia a cada 2 anos para mulheres com idade de 50 a 74 anos
United Kingdom National Health Service Breast Screening Program (Reino Unido), 2010	Mamografia a cada 3 anos para mulheres com idade de 47 a 73 anos
Canadian Task Force on Preventive Health Care (Canadá), 2011	Mamografia de rotina para mulheres com idade de 50 a 74 anos
National Cancer Institute (Estados Unidos), 2012	Mamografia a cada 1 ou 2 anos para mulheres com idade $\geq$ 40 anos
Breast Screen Australia Program (Austrália), 1996	Mamografia a cada 2 anos para mulheres com idade de 50 a 69 anos
American Cancer Society (Estados Unidos), 2013	Mamografia anual iniciada aos 40 anos de idade
SBM, CBR, FEBRASGO (Brasil), 2012	Mamografia anual entre 40 e 69 anos de idade
Ministério da Saúde (Brasil), 2015	Mamografia a cada 2 anos
National Centre for Screening Monitoring (Itália), 2005	Mamografia a cada 2 anos para mulheres com idade de 50 a 69 anos

SBM: Sociedade Brasileira de Mastologia; CBR: Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem; FEBRASGO: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia

Recomendações da *European Society of Medical Oncology* (ESMO) preconizam o rastreamento do câncer de mama em mulheres com risco padrão a ser realizado na faixa etária de 50 a 69 anos com mamografia bianual, não havendo recomendação-padrão para outras faixas etárias. As mesmas recomendações são válidas para a *Japanese Society of Medical Oncology* (JSMO).

No Brasil, o Ministério de Saúde, através da Portaria Portaria Nº 61, de 1º de outubro de 2015, preconiza que o rastreamento do câncer de mama, na população de risco padrão, deve ser realizado na faixa etária de 50 a 69 anos, com mamografia bianual.

Mesmo que o rastreamento do câncer de mama através do uso da mamografia seja uma das intervenções mais estudadas e debatidas nas últimas décadas, muitas controvérsias ainda persistem sobre o assunto, sendo os principais pontos de divergência a idade ideal para início do rastreamento e a periodicidade da realização do exame mamográfico. O maior consenso existente na literatura é a realização da mamografia a cada 2 anos em mulheres com idade entre 50 e 69 anos. A eficácia do rastreamento em mulheres com idade entre 40 e 49 anos e com 70 anos ou mais é bastante questionada em todo o mundo.

### **1.1.3 Diagnóstico do câncer de mama**

O diagnóstico do câncer de mama é baseado na combinação da avaliação clínica com um método de imagem e na confirmação por exame histopatológico (SENKUS et al. 2013).

A anamnese deve incluir avaliação da idade da paciente, status menopausal, história familiar de câncer de mama e pesquisa de queixas que possam estar relacionadas ao câncer de mama, tais como surgimento de nódulo em mama e/ou região axilar, além de eventual doença metastática em ossos, pulmões ou fígado. O exame físico deve constar de inspeção e palpação bimanual das mamas e da região axilar, além da pesquisa de doença metastática. Métodos de imagem com finalidade diagnóstica incluem a mamografia bilateral e ultrassonografia das mamas e região axilar. A ressonância magnética não é um método que deve ser utilizado na rotina diagnóstica, podendo ser empregado em situações como: história familiar de

câncer de mama associado a mutações nos genes BRCA, implantes mamários, carcinoma lobular invasor ou quando há grandes disparidades entre a avaliação clínica e os resultados dos métodos de imagem convencionais (SENKUS et al. 2013).

A confirmação do diagnóstico do câncer de mama é feita através da avaliação histopatológica, obtida preferencialmente através de biópsia por agulha grossa (*core biopsy*) guiada por ultrassonografia ou estereotáxica (SENKUS et al. 2013). No diagnóstico histopatológico, devem constar informações como tipo histológico, grau tumoral e status dos biomarcadores receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER2. Avaliação histopatológica de linfonodos axilares no momento do diagnóstico deve ser realizada apenas na suspeita clínica de metástases, o mesmo se aplicando para pesquisa de metástases viscerais.

#### **1.1.4 Estadiamento do câncer de mama**

O estadiamento consiste em avaliar a extensão locorregional e à distância da neoplasia, auxiliando na conduta terapêutica mais adequada para cada caso e na elaboração do prognóstico das pacientes. O sistema TNM é o mais utilizado, levando em consideração a neoplasia (parâmetro T), o acometimento de linfonodos regionais (parâmetro N), e a pesquisa de metástases à distância (parâmetro M). Através da correlação entre os parâmetros T, N e M se estabelece o estadiamento final do câncer de mama, cujo resultado encontra-se no anexo 1.

Para fins de estadiamento do câncer de mama, podem ser utilizados exames laboratoriais, tais como hemograma, glicemia, ureia, creatinina, fosfatase alcalina e aminotransferases hepáticas, além de eletrocardiograma e radiografia de tórax. Em casos selecionados, tais como doença avançada ao diagnóstico, alteração de exames laboratoriais ou sintomatologia óssea, podem ser utilizados ultrassonografia abdominal, cintilografia óssea, tomografia computadorizada de tórax e abdome, ressonância magnética e PET-CT.

#### **1.1.5 Tratamento do câncer de mama**

Para o tratamento do câncer de mama, diversas modalidades terapêuticas podem ser utilizadas, isoladamente ou, mais comumente, em associação, levando-se em consideração as especificidades de cada caso. Dentre as opções terapêuticas disponíveis, tem-se cirurgia, radioterapia, quimioterapia neoadjuvante e adjuvante, hormonioterapia e terapia-alvo molecular.

Vários são os parâmetros norteadores da modalidade de tratamento a ser empregada, entre eles algumas características clínicas das pacientes, estadiamento TNM, estadiamento prognóstico, características patológicas e imunofenotípicas da neoplasia e a realização ou não de tratamentos prévios. Essas características também são consideradas para classificar o risco de recorrência da doença em baixo, moderado ou alto, orientando assim a administração de tratamento quimioterápico adjuvante: as pacientes mais beneficiadas seriam aquelas com tumor com maior risco de recorrência.

### **1.1.6 Classificação molecular do câncer de mama**

Cerca de 75% dos tumores de mama correspondem ao tipo histológico “não especial”, enquanto os demais 25% correspondem a pelo menos 17 outros tipos histológicos de câncer de mama, cada um deles correspondendo a uma proporção discreta (WEIGELT et al. 2008). Nos dias atuais, está claro que o câncer de mama é uma doença heterogênea, com importantes variações em suas características histológicas e biológicas em decorrência de seu perfil genético, epigenético e transcriptomal, acarretando em diferenças fenotípicas, as quais se refletem no tratamento e no prognóstico dessa doença (ELIYATKIN et al. 2015).

Tradicionalmente, o câncer de mama é classificado de acordo com seu tipo histológico e grau tumoral, este atribuído a partir de um escore que considera o grau nuclear, formação de túbulos e contagem de mitoses (ELSTON e ELLIS 1991). O laudo histopatológico constitui um importante instrumento diagnóstico e de orientação terapêutica para o câncer de mama, porém é insuficiente em descrever as diferenças existentes entre tumores de pacientes que tem o mesmo tipo histológico, o mesmo grau e o mesmo estadiamento no que diz respeito a fatores prognósticos e preditivos, e também em relação à utilização de terapias-alvo para o câncer de mama, tais como moduladores seletivos do receptor de estrogênio (tamoxifen) ou trastuzumab, utilizado em tumores com amplificação de HER2 (ELIYATKIN et al. 2015).

PEROU et al. (2000) pesquisaram o perfil de expressão gênica em amostras de tecido mamário tumoral e não tumoral, pertencentes a 42

indivíduos diferentes, dentre 8102 genes humanos. Os autores relataram que os tumores tem muita variação de expressão gênica entre si, e que essas diferenças são maiores entre tumores pertencentes a pacientes diferentes do que em diferentes amostras de tumores pertencentes ao mesmo paciente. Assim sendo, os tumores poderiam ser classificados de acordo com o perfil de expressão gênica, e propuseram a expressão “classificação molecular” para o câncer de mama. A classificação proposta por esses autores divide o câncer de mama em grupos, de acordo com seu perfil de expressão gênica, a saber: (1) luminal, que pode ser subdividido em luminal A e luminal B, os quais expressam receptor de estrogênio, reguladores do receptor de estrogênio, citoqueratinas e outros genes normalmente expressos nas células luminiais de tecido mamário normal; (2) superexpressão de HER2, refletindo amplificação de hiperexpressão de HER2; e (3) basal, que não expressam receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER2, mas expressam genes habitualmente expressos por células basais / mioepiteliais do tecido mamário normal. Na prática clínica, justamente pela ausência de expressão de receptores hormonais e do HER2, são chamados de “triplo-negativos”.

De acordo com o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), o câncer de mama é classificado em 4 subtipos de acordo com o status de expressão de receptores hormonais (RH) e HER2: RH<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>, RH<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup>, RH<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> e RH<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup> (National Comprehensive Cancer Network, 2016). Considerando a classificação de Saint Gallen 2015, o câncer de mama é subdividido em 5 subtipos: luminal A, com alta expressão de receptores

hormonais (RE e RP), HER2 negativo, Ki67 < 14%, estadios T1 ou T2 e N0 ou N1 ao diagnóstico; luminal B/HER2 negativo, o qual apresenta baixos índices de expressão de RE e RP, ausência de expressão de HER2, Ki67  $\geq$  20%, estadiamento T3 e N2 ou N3 ao diagnóstico, grau histológico 3 e invasão angiolinfática extensa; luminal B/HER2 positivo (com expressão de receptores hormonais e positivo para HER2); HER2, negativo para receptores hormonais e positivo para HER2; and triplo negativo, negativo para expressão de receptores hormonais e de HER2 (COATES et al. 2015).

Carcinomas do tipo luminal A são positivos para a expressão do receptor de estrogênio e apresentam baixo grau histológico. Tumores do tipo luminal B também expressam receptor de estrogênio, porém podendo expressar baixos níveis de receptores hormonais e apresentam alto grau histológico. Uma outra característica que diferencia os tumores luminais esporádicos dos basais é a associação da disfunção da via de BRCA1, gene supressor tumoral envolvido no reparo do DNA, ativação do ciclo celular e manutenção da estabilidade cromossômica, causada por metilação da região promotora de BRCA1, inativação durante a transcrição ou por ambos os mecanismos. Esses achados estão em consonância com o fato de praticamente todos os tumores com mutação de BRCA1, esporádicos ou germinativos, serem do subtipo basal (SOTIRIOU e PUSZTAI 2009).

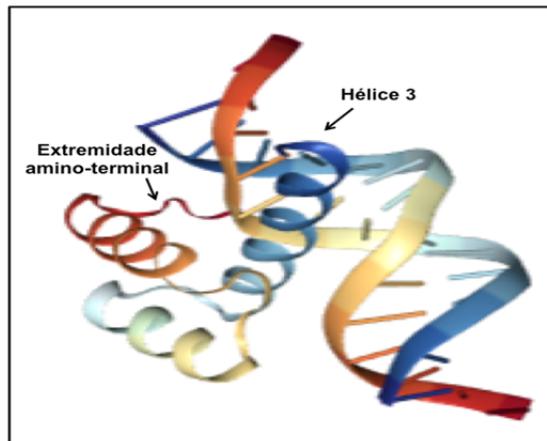
Não somente em relação ao perfil de expressão gênica, esses subgrupos também diferem quanto à correlação clínica e histológica, prognóstico e resposta à terapia. Tumores subtipo luminal A totalizam 50% dos carcinomas mamários invasivos, geralmente com histologia do tipo não

especial de baixo grau histológico, tubular, cribriforme ou lobular clássico, tem boa resposta à terapia endócrina (moduladores seletivos do receptor de estrogênio ou inibidores da aromatase), resposta variável à quimioterapia e bom prognóstico. Os tumores do subtipo luminal B respondem por 20% dos carcinomas mamários invasivos, apresentam índice proliferativo e grau histológico mais altos que tumores do subtipo luminal A, geralmente tem histologia do tipo não especial ou micropapilífero, sua resposta à terapia endócrina é variável, porém não tão boa quanto os tumores do subtipo luminal A, e tem resposta à quimioterapia também variável, porém melhor que tumores do subtipo luminal A, e prognóstico não tão bom quanto os tumores luminal A. Tumores com hiperexpressão de HER2 correspondem a 15% do total dos carcinomas mamários, tem alto grau histológico e alto índice proliferativo, histologia do tipo não especial de alto grau, maior ocorrência de metástases linfonodais, boa resposta à terapia-alvo com trastuzumab, resposta à quimioterapia com antraciclinas e prognóstico desfavorável. Por fim, tumores basais correspondem a cerca de 15% do total de carcinomas mamários invasivos, apresentam alto índice proliferativo, histologia do tipo não especial de alto grau, metaplásico ou medular, ausência de resposta à terapia endócrina e/ou com trastuzumab, sensibilidade à quimioterapia com drogas do grupo platinas (esquemas contendo Antraciclina e Taxano) e na maioria das vezes tem o pior prognóstico (ELIYATKIN et al. 2015).

## 1.2 GENES HOMEBOX

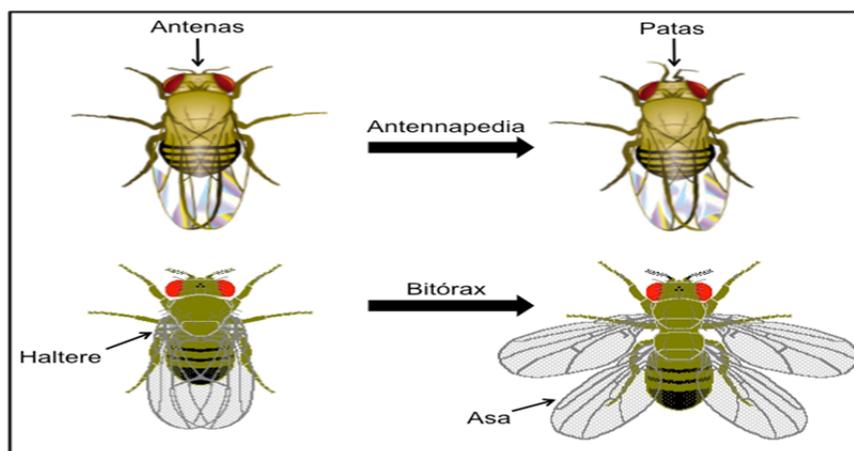
### 1.2.1 Definição e histórico

Os genes homeobox (HOX genes) são genes reguladores do desenvolvimento, através da atuação no comando de ordenações genéticas que regulam aspectos relacionados à embriogênese, morfogênese, diferenciação celular e regeneração em organismos simples e complexos (NUNES et al. 2003). São expressos durante o desenvolvimento embrionário em todos os órgãos e tecidos (e também durante toda a vida adulta) e altamente conservados ao longo da evolução das espécies (LAPPIN et al. 2006). Tem essa denominação por possuírem uma sequência característica de DNA, o homeobox, a qual consiste em uma sequência de 180 pares de bases, e codifica uma proteína nuclear específica, a homeoproteína (ou homeodomínio), com 60 aminoácidos, que atua como fator de transcrição, promovendo ativação, inibição ou modulação dos genes-alvo. A estrutura dessa proteína tem a conformação hélice-alça-hélice, sendo que a terceira hélice, conhecida como hélice de reconhecimento, insere-se no sulco principal do DNA, e a extremidade amino-terminal insere-se no sulco menor adjacente (Figura 7). Em diferentes organismos, observa-se uma similaridade na sequência de aminoácidos do homeodomínio, bem como nos padrões de expressão durante o desenvolvimento. Acredita-se que as homeoproteínas atuem em genes que promovem a formação de moléculas de adesão, proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento (CARÉ et al. 1996).



Fonte: Adaptado de ROSE et al. (2017).

**Figura 7** – Representação esquemática do homeodomínio e da ligação ao DNA.



Fontes: LINDSLEY e GRELL (1972).

**Figura 8** – Mutações *Antennapedia* e *Bithorax*.

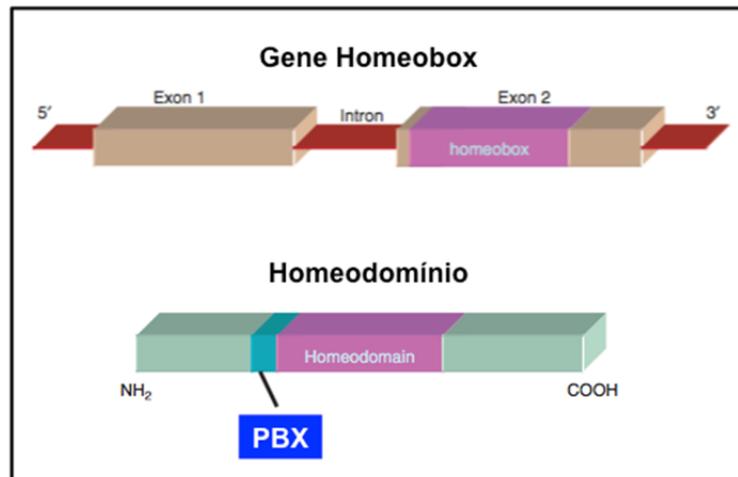
Os genes homeobox foram primeiro descobertos ao se pesquisar duas mutações ocorridas no genoma da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, as quais provocaram a troca de um segmento corporal por outro, fenômeno conhecido como homeose (na ocasião, houve troca de antenas por patas, e de um haltere, órgão relacionado ao equilíbrio nesses animais, por parte de uma asa – mutações conhecidas como *antennapedia* e *bithorax*, respectivamente, como demonstrado na Figura 8. Mais tarde, foi

descoberto que os mutantes *antennapedia* constituíam um grupo de 5 genes homeobox (*Lab*, *Pb*, *Dfd*, *Scr* e *Antp*) e os mutantes *bithorax* na verdade faziam parte de um grupo de 3 genes homeobox (*Ubx*, *Abd-A* e *Abd-B*) (GRIER et al. 2005).

### 1.2.2 Estrutura dos genes homeobox

Estruturalmente, os HOX genes de mamíferos são pequenas moléculas, contendo apenas dois éxons e um íntron, variando de apenas algumas poucas bases (menos de 200) até vários kilobases. O homeobox, região responsável pela codificação do homeodomínio, sempre encontra-se no interior do segundo éxon. Proteínas conhecidas como não-HOX, tais como TALE (three-amino-acid-loop-extension) proteínas PBX e MEIS, funcionam como cofatores para o homeodomínio, reforçando sua afinidade e especificidade na ligação ao DNA. Ligam-se a sequências curtas de aminoácidos, flanqueando o homeodomínio. Amplamente expressas em tecidos fetais e adultos, TALE proteínas PBX ligam-se preferencialmente à extremidade 3' do homeodomínio, enquanto que proteínas MEIS interagem com a extremidade 5'. A Figura 9 mostra a representação esquemática da estrutura de um gene homeobox e do homeodomínio, com sítio de ligação da TALE proteína PBX.

A sequência homeobox também é verificada em genes não homeóticos da *Drosophila*, os quais não estão localizados de forma agrupada em seu genoma, mas sim de forma dispersa: são os chamados genes não agrupados ou divergentes.



Fonte: Adaptado de GRIER et al. (2005).

**Figura 9** – Estrutura do gene homeobox e da homeoproteína.

### 1.2.3 Classificação dos genes homeobox

Diversas são as formas de subdivisão que podem ser utilizadas para esses genes, por exemplo subdividindo-os em superclasses, classes e subclasses ou grupos. Porém, a forma mais consensual de classificação é agrupá-los em famílias, justamente por melhor refletir a diversidade evolutiva, agrupando os genes mais similares entre si em famílias, e as famílias em classes, e assim por diante (HOLLAND et al. 2007).

Em vertebrados, a família dos genes homeobox se divide em duas subfamílias: os genes agrupados, conhecidos como HOX genes ou classe I (contrapartida dos grupos *antennapedia* e *bithorax* em *Drosophila*), e os não agrupados ou divergentes.

Os HOX genes tem grande homologia em relação aos genes homeobox que foram descobertos da *Drosophila* (estes conhecidos como complexo homeótico, HOX-C), e em humanos, são representados por pelo menos 39 genes agrupados em 4 grupos genômicos (HOXA, HOXB, HOXC

e HOXD), os quais postula-se que surgiram por duplicação e divergência de HOX gene ancestral comum (IZPISÚA-BELMONTE e DUBOULE 1992). Estão organizados em 13 grupos parálogos, baseando-se na semelhança da região homeobox e na localização no interior de cada grupo, e localizados em diferentes cromossomos: 7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q21, respectivamente, e contendo entre 9 e 11 genes. Genes homeobox dos grupos 1 a 8 são mais estritamente relacionados ao *antennapedia* – *Antp*, e grupos de 9 a 13, mais ligados ao *abdominal-b* – *Abd-B*.

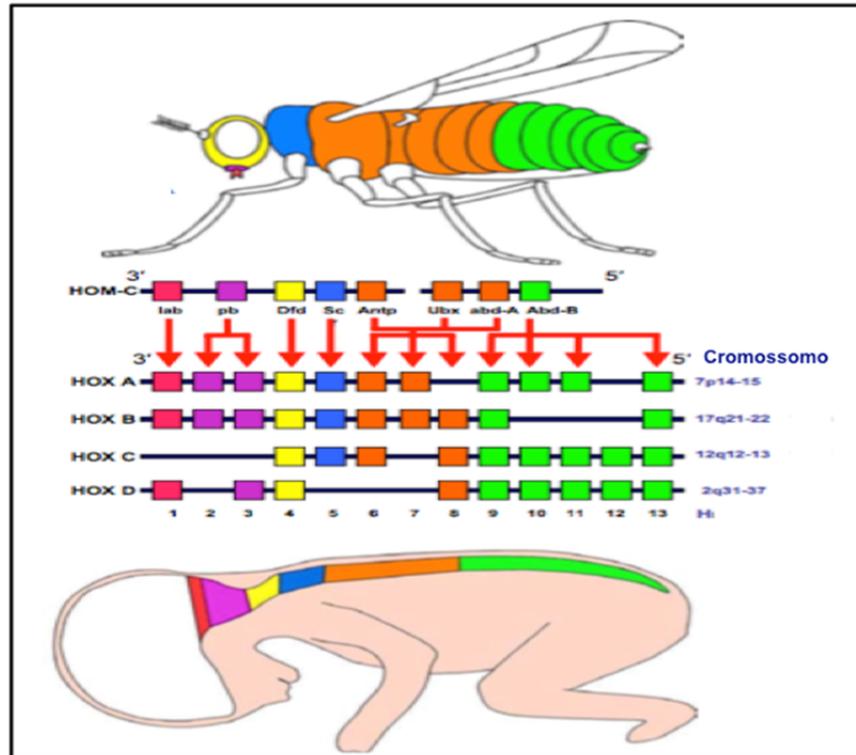
#### 1.2.4 HOX genes e embriogênese

Durante a embriogênese, os HOX genes são expressos em um padrão que corresponde à sua localização espacial ao longo do eixo ântero-posterior: os genes localizados mais próximos da extremidade 3', em geral de número mais baixo, por exemplo HOXA1, são expressos nas porções mais anteriores e mais precocemente, enquanto aqueles localizados mais próximos da extremidade 5', em geral com números mais altos, como HOXA13, são expressos na porção posterior e mais tardiamente. Vemos, portanto, que a expressão dos HOX genes durante a embriogênese reflete sobretudo as suas respectivas posições cromossômicas, obedecendo ao princípio da colinearidade (espacial e temporal) (GRIER et al. 2005). Em áreas adjacentes às áreas de expressão gênica, ocorre o fenômeno da prevalência posterior: os genes expressos posteriormente e mais tardiamente tem dominância sobre os genes expressos anteriormente e mais precocemente (QUINONEZ e INNIS 2014). A Figura 10 demonstra a

localização dos HOX genes humanos nos respectivos cromossomos, bem como a semelhança funcional com os genes do complexo homeótico da mosca *Drosophila*.

Na formação do embrião, determinados grupos de células, conhecidas como domínios funcionais, tornam-se responsáveis pela formação de determinadas estruturas corporais viscerais e de sustentação. Para tal, necessitam de informações adequadas acerca de localização espacial e expressão temporal visando a formação de uma estrutura em específico. E a expressão dos HOX genes nesses domínios funcionais, ao longo do eixo ântero-posterior, codifica a formação de estruturas específicas, tais como vísceras e membros, em sua respectiva e adequada localização (LAPPIN et al. 2006).

No processo de formação dos membros dos vertebrados, HOX genes definem padrões de desenvolvimento. Nas porções proximais, onde se desenvolvem o fêmur e o úmero, observa-se expressão de HOXA9, o qual também é expresso, juntamente com HOXA10 e HOXA11, nas porções anteriores dos membros, região de desenvolvimento do rádio e da ulna ou da tíbia e fíbula. Nas porções distais dos membros (punho e tornozelo), são expressos os genes de HOXA9 a HOXA13. Um padrão semelhante de expressão é encontrado para o cluster HOXD. Pelo menos 23 genes HOX são expressos durante a formação dos membros (LAPPIN et al. 2006).



Fonte: Adaptado de LAPPIN et al. (2006).

**Figura 10** – Localização dos HOX genes em humanos e semelhança funcional com HOM-C da *Drosophila*.

Em relação à formação dos pulmões em humanos, os genes da extremidade 3' dos clusters HOXA e HOXB são expressos em maior concentração nos estágios iniciais da ontogênese, com progressiva diminuição de sua expressão à medida que avança o processo de formação pulmonar. No entanto, o gene HOXA5 permanece expresso em altas concentrações até o término da morfogênese pulmonar, desde a formação da árvore brônquica até a maturação do pulmão (LAPPIN et al. 2006).

### 1.2.5 HOX genes na vida adulta

Além de serem expressos durante a embriogênese, durante a qual desempenham papel importante na formação de órgãos, os HOX genes também são expressos na vida adulta. Não obstante, cada órgão ou tecido apresenta padrões específicos de expressão (SVINGEN e TONISSEN 2003).

Na vida adulta, apenas alguns HOX genes esporádicos são ativos em células normais (CILLO et al. 2001). TIBERIO et al. (1994), demonstrou a expressão de 11 HOX genes no pulmão normal de adultos, restrita à expressão de 5 genes da extremidade 3' do locus HOXA (HOXA2 até HOXA6), o mesmo ocorrendo com o locus HOXB (HOXB2 a HOXB6) e HOXD1. Considerando outros órgãos, tais como rim e cólon, CILLO et al. (1992) e DE VITA et al. (1993) também demonstraram resultados semelhantes de expressão dos HOX genes: cada órgão tem um padrão específico de expressão, diferindo entre si quanto aos genes ativos ou silenciados, e os genes ativos diferem entre si quanto ao tamanho da região transcrita, corroborando a ideia de diferentes padrões de expressão dos HOX genes em diferentes órgãos ao longo do eixo ântero-posterior do embrião. MAGLI et al. (1991) demonstrou que os HOX genes exibem padrões específicos de expressão em diferentes linhagens de células hematopoiéticas, que agem ou são inativos em conjunto, sugerindo a participação desses genes no início da diferenciação hematopoiética.

### **1.2.6 HOX genes, oncogênese e neoplasias**

Os processos de embriogênese e carcinogênese compartilham muitas características comuns, sendo que muitos consideram a tumorigênese como uma forma aberrante de organogênese, sendo que muitas vias metabólicas, por exemplo Wnt, são desreguladas em vários tipos diferentes de câncer, e essa desregulação contribui significativamente no processo de formação e proliferação das neoplasias. De modo análogo, HOX genes também constituem exemplos de íntima relação entre organogênese e tumorigênese, visto que muitos HOX genes são expressos de forma aberrante em neoplasias (SAMUEL e NAORA 2005).

Diversos são os mecanismos genéticos que causam desregulação dos genes homeobox: translocações, perda de heterozigose, amplificação gênica, metilação do DNA, modificação da cromatina e repressão da expressão por RNA não codificantes (HARIA e NAORA 2013). O Quadro 2 traz alguns exemplos de mecanismos genéticos responsáveis pela desregulação de HOX genes e respectivas neoplasias associadas.

**Quadro 2** - Alguns exemplos de mecanismos genéticos associados à tumorigênese dos HOX genes

Alteração genética	Exemplo	Neoplasia
Translocação	t(7;11)(p15;p15) NUP98-HOXA9	Leucemia Mieloide Aguda
Perda de heterozigose	8p21 NKX3.1	Carcinoma de próstata
Hiperexpressão	17q21-22 HOXB7	Carcinoma de mama
Metilação do DNA	HOXA10	Carcinoma de endométrio
Alteração da cromatina	Caudas de resíduos de histona	Carcinoma de mama
RNA não codificante	RNA não codificante longo HOTAIR	Carcinoma de mama

Em geral, podemos dividir os padrões inapropriados de expressão dos genes homeobox em 3 categorias: (1) re-expressão dos HOX genes em tumores oriundos de tecidos que expressam os HOX genes normalmente durante a embriogênese: os genes são expressos predominantemente no início da morfogênese, inativados após a diferenciação tecidual e re-expressos de forma aberrante em tumores, como ocorre em tumores renais, cerebrais e mamários. Esta é a forma mais comum de tumorigênese associada aos HOX genes, em geral os HOX genes envolvidos nesse processo exibem atividade promotora de proliferação tumoral (HARIA e NAORA 2013); (2) genes homeobox são expressos em tumores derivados de tecidos que não os expressam durante a embriogênese: meduloblastoma com expressão de PAX5, gene não expresso no cerebelo neonatal; e (3) HOX ge-

nes desregulados (“downregulated”) em tumores derivados de tecidos que expressam HOX genes em diferentes estágios da morfogênese. Isso ocorre tipicamente com genes expressos mais tardiamente no processo de diferenciação tecidual, cuja expressão é mantida após completada a formação do órgão, e desregulada durante a progressão tumoral, e os genes homeobox envolvidos nesse processo geralmente tem atividade de supressor tumoral (HARIA e NAORA 2013). Nkx3.1 é expresso no tecido prostático na vida adulta, e perdido na neoplasia da próstata (CHRISTENSEN et al. 2008).

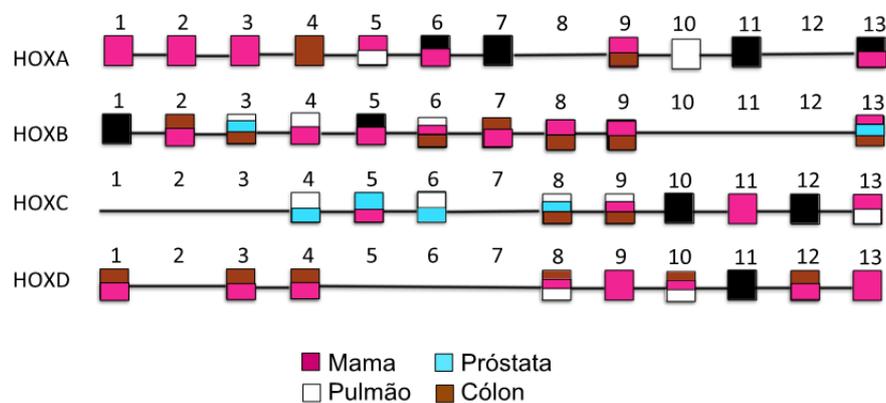
Há uma variedade de mecanismos celulares e moleculares através dos quais os HOX genes desencadeiam eventos cruciais à carcinogênese, a saber: (1) estimulação continuada de vias de proliferação, através da estimulação autócrina por fatores de crescimento. Por exemplo, HOXB7 induz transcrição do gene do Fator de Crescimento de Fibroblasto-2 (FGF-2) e induz o crescimento de melanomas e carcinomas de mama e ovário (CARÉ et al. 1996), e HOXA9 induz a expressão de ciclina D1 em células leucêmicas através da ligação ao Fator de Iniciação da Tradução eIF4E e estimula exportação do RNAm da Ciclina D1 dependente de eIF4E (TOPISIROVIC et al. 2005); (2) evasão de supressores de crescimento, como ocorre com CDX2 ao induzir a expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) através de ativação transcricional, mas estabiliza os níveis da proteína inibidora de CDK através de um mecanismo não transcricional; (3) resistência à morte celular: HOXA10 estimula a formação de agregados de células de tumores ovarianos, tornando-as

resistentes à anoiquia; (4) angiogênese, mecanismo pelo qual muitas homeoproteínas induzem crescimento e progressão tumoral por estímulo pró-angiogênico, caso de HOXB7 que induz o fator de crescimento do endotélio vascular A (VEGF-A) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), estimulando a angiogênese em carcinomas de mama e mieloma múltiplo (CARÉ et al. 2001); (5) uma das principais características das neoplasias é a habilidade de invadir tecidos adjacentes e colonizar sítios à distância, processo fundamentalmente relacionado à perda do fenótipo epitelial e aquisição de características mesenquimais, ao que chamamos de transição epitélio-mesênquima, processo induzido por TGF- $\beta$ . Sabe-se que HOXA10 induz a transição epitélio-mesênquima e inibe invasividade, e sua expressão é silenciada em carcinomas endometriais de alto grau (YOSHIDA et al. 2006).

Alterações na expressão de vários dos HOX genes é observada em várias malignidades, sólidas e hematológicas, porém ainda permanece incerto se essas alterações são causas ou consequências da tumorigênese (SAMUEL e NAORA 2005). Postula-se que a inativação dos HOX genes leva à ativação de funções de desenvolvimento normalmente não observadas nesses genes, contribuindo assim para formação e progressão de tumores. Homeoproteínas atuam durante angiogênese, proliferação, adesão e migração celular, diferenciação e apoptose, e alterações nessas proteínas certamente podem desencadear um processo de tumorigênese, bem como estimular a progressão tumoral (GRIER et al. 2005). GIDEKEL et al. (2003) demonstraram que o gene Oct-4 está envolvido na tumorigênese

de células germinativas de forma dose-dependente, revelando importantes diferenças importantes entre os HOX genes e os demais oncogenes: HOX genes são tecido-restritos, muitas vezes desenvolvimento-restritos, podem estar associados a estágios precoces de tumorigênese e são dosagem-sensíveis, fazendo-os, dessa forma, interessantes alvos terapêuticos.

BHATLEKAR et al. (2014) pesquisaram o envolvimento dos HOX genes no processo de oncogênese. Os autores descobriram que os HOX genes estão envolvidos no processo de formação de vários tipos de câncer, promovendo a carcinogênese ao codificar proteínas que atuam como fatores transcricionais reguladas positivamente em células neoplásicas, estimulando vias de sinalização que conduzem ao processo de oncogênese, e também atuando como fatores de supressão de determinadas vias metabólicas.



**Fonte:** Adaptado de BHATLEKAR et al. (2014).

**Figura 11** – Expressão aberrante de HOX genes em alguns tumores sólidos humanos.

A exemplo do que acontece no processo de formação dos órgãos, nas neoplasias também se observa a expressão de genes específicos em diferentes tipos de neoplasias. Dentre todos os HOX genes em humanos,

apenas dois deles, HOXC10 e HOXC12, não tiveram sua expressão detectada em tumores sólidos. A Figura 11 representa a relação de HOX genes expressos em alguns tipos de tumores sólidos em humanos.

Diversos estudos pesquisaram a expressão dos HOX genes em tumores sólidos e tecido normal de determinados órgãos. A seguir, citamos alguns exemplos de estudos que objetivaram essa comparação.

KANAI et al. (2010) compararam a expressão de HOX genes em células normais e neoplásicas de cólon. Os autores encontraram expressão mais elevada de HOXA13 em tecido normal em relação ao neoplásico, além de diferenças na localização anatômica do tecido normal: HOXA13 e HOXB13 são mais comumente expressos no cólon esquerdo em relação ao cólon direito normal, e HOXA9, HOXB3, HOXB8 e HOXB9 eram mais expressos em neoplasias em comparação ao tecido normal.

MILLER et al. (2003) pesquisaram a expressão de HOX genes em tecido prostático normal e neoplásico por transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase. Esse estudo demonstrou uma expressão aumentada de genes do grupo HOXC em linhagens celulares de câncer de próstata e em células oriundas do tumor e de metástases linfonodais, particularmente os genes HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC8.

Comparando a expressão de todos os HOX genes através da técnica da reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real em tumores não pequenas células de pulmão e em tecido pulmonar normal, ABE et al. (2006) encontraram significativo aumento da expressão de HOXA1, HOXA5, HOXA10 e HOXC6 em carcinomas epidermóides, e

aumento da expressão HOXA5 e HOXA10 em adenocarcinomas, em relação ao tecido pulmonar normal. Comparando a expressão dos HOX genes nesses dois tumores, os autores encontraram maior expressão de HOXA1, HOXD9, HOXD10 e HOXD11 em carcinomas epidermóides.

Em tumores cerebrais, particularmente o glioblastoma, estudos tem demonstrado aumento da expressão dos HOX genes, correlacionando essa elevação com redução da sobrevida nesses tumores. COSTA et al. (2010) demonstraram que a expressão aberrante de HOXA9 foi fator prognóstico negativo independente, associado à redução da sobrevida global e livre de doença de pacientes com glioblastoma. TABUSE et al. (2011) encontraram alta expressão de HOXD9 em gliomas humanos e em linhagens celulares de gliomas. Ao silenciar HOXD9 em culturas de células derivadas de glioma, os autores observaram redução da proliferação celular, lentificação do ciclo celular e indução de apoptose, sugerindo que HOXD9 contribui para proliferação e sobrevida celular.

Na glândula tireoide, também foram encontrados padrões aberrantes de expressão dos HOX genes em relação ao tecido tireoidiano normal. CANTLE et al. (2013) demonstraram expressão anormal dos HOX genes através de imunohistoquímica e RT-qPCR: todos os HOX genes parálogos do grupo 13 (HOXA13, HOXB13, HOXC13 e HOXD13) exibiram aumento da expressão em adenoma folicular, carcinoma folicular e carcinoma papilífero da tireoide. TAKAHASHI et al. (2010) demonstraram diferenças na expressão de HOX genes entre tecido tireoidiano normal e carcinomas anaplásicos de tireoide através de RT-qPCR. O tecido tireoidiano normal

não apresentou expressão de HOXB1, HOXB9 e de nenhum dos parálogos dos grupos 10 a 13. Várias linhagens de células derivadas de carcinomas anaplásicos de tireoide expressaram os HOX genes não expressos no tecido tireoidiano normal. HOXD9 foi expresso no tecido normal mas não em tumores, e HOXB1, D10, C12 e D13 não foram expressos em tecido normal nem tumoral, e HOXB4 foi o único gene expresso em tecido normal e tumoral.

Tumores ovarianos também foram estudados para verificar sua associação com HOX genes. CHENG et al. (2005) encontraram expressão de HOX genes em tumores epiteliais ovarianos, variando conforme o padrão mulleriano de diferenciação desses tumores. HOX genes não foram expressos no epitélio de superfície ovariano normal. Expressão ectópica de HOXA9 em modelos murinos originou tumores epiteliais papilíferos que lembravam os tumores epiteliais serosos, enquanto que HOXA10 induziu tumores com morfologia endometriode, e HOXA11, tumores mucinosos-like. HOXA7 não foi correlacionado com nenhum padrão morfológico específico, mas está relacionado à promoção da tumorigênese por HOXA9, HOXA10 e HOXA11 em suas respectivas vias de sinalização.

Tumores do trato urinário também estão associados à expressão aberrante de HOX genes. CANTILE et al. (2003a) avaliaram a expressão de todos os HOX genes em tecido urotelial normal e em tumores uroteliais pela técnica RT-qPCR. Os autores encontraram variações dramáticas na expressão de 3 genes do locus C: HOXC4, HOXC5 e HOXC6, e também em genes parálogos do grupo 11, HOXA11, HOXC11 e HOXD11. Genes do

locus C encontraram-se superexpressos em tumores uroteliais, e os parálogos do grupo 11 eram silenciados no urotélio normal e expressos nos tecidos tumorais. CANTILE et al. (2011) pesquisaram os padrões de expressão dos HOX genes em tecido proveniente de fetos em estágio final de organogênese e em carcinomas renais de células claras. Novamente, demonstrou-se que o aumento da expressão dos genes parálogos do grupo 11 HOXA11, HOXC11 e HOXD11, foram relacionados à carcinogênese renal.

Utilizando amostras provenientes de culturas de células, SVINGEN e TONISSEN (2003) pesquisaram as diferenças entre os padrões de expressão de 20 HOX genes em tecido cutâneo e mamário normal e neoplásico. Nas linhagens de células representantes do melanoma, houve diferenças no padrão de expressão de vários dos HOX genes estudados em relação à expressão das células epiteliais normais, bem como entre as diferentes linhagens de células tumorais, com alterações principalmente relacionadas ao locus B, sendo HOXB1, B9 e B13 com expressão aumentada e os demais membros do locus B com expressão reduzida em linhagens tumorais. O gene HOXA4 mostrou expressão aumentada, enquanto HOXA7, A3 e C4 tiveram expressão reduzida. Essas alterações foram comuns à maioria das linhagens celulares representantes de melanoma.

O Quadro 3 traz uma relação de estudos que pesquisaram a expressão de HOX genes em diferentes tumores sólidos humanos, utilizando amostras provenientes de culturas de células, modelos animais

e/ou tecidos humanos. As técnicas empregadas para pesquisa da expressão gênica foram imunohistoquímica e/ou RT-qPCR. No quadro, encontram-se os genes avaliados em cada estudo e os respectivos tumores sólidos, juntamente com as referências.

**Quadro 3 - Alterações de HOX genes em diferentes tumores sólidos**

HOX genes	Alteração	Tumores	Referências
HOXA9, HOXB3, HOXB8, HOXB9	↑	Cólon	Kanai et al. (2010)
HOXB2, HOXB13, HOXD1, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD12	↓	Cólon	Kanai et al. (2010)
HOXB7	↑	Cólon	Liao et al. (2001)
HOXB6, HOXB8, HOXC8, HOXC9	↑	Cólon	Vider et al. (2000)
HOXA4, HOXD10	↑	Cólon Mama	Bhatlekar et al. (2014)
HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXC11, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9, HOXD10	↑	Mama	Makiyama et al. (2005)
HOXA6, HOXA13, HOXB2, HOXB4, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB9, HOXC5, HOXC9, HOXC13, HOXD1, HOXD8	↓	Mama	Hur et al. (2014)
HOXD12, HOXD13	↑	Mama	Makiyama et al. (2005)
HOXC5	↑	Mama	Makiyama et al. (2005)
HOXA5	↑	Mama	Raman et al. (2000), Chen et al. (2004, 2005)
HOXD3	↓	Mama	Shaoqiang et al. (2013)
HOXB13	↑	Mama Próstata	Shah et al. (2013)
HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8	↑	Próstata	Miller et al. (2003)
HOXC6	↑	Próstata	Ramachandran et al. (2005)
HOXB3	↑	Próstata	Chen et al. (2013)
HOXB13	↑	Pulmão Próstata	Huang et al. (2014)
HOXA	↑	Pulmão	Omatu et al. (1999)
HOXC4, HOXC8, HOXC9, HOXC13, HOXD8, HOXD10	↑	Pulmão	Omatu et al. (1999)
HOXA5, HOXA10	↓	Pulmão	Abe et al. (2006)
HOXB3, HOXB4, HOXC6	↑	Pulmão Glioblastoma	Bodey et al. (2000)
HOXA9	↑	Glioblastoma	Costa et al. (2010)
HOXA10	↑	Glioblastoma	Murat et al. (2008)
HOXD9	↑	Glioma Tireoide	Tabuse et al. (2011)
HOXA13, HOXB13, HOXC13, HOXD13	↑	Tireoide	Cantile et al. (2013)
HOXB1, HOXB9	↑/↓	Tireoide	Takahashi et al. (2004)
HOXA9, HOXA10, HOXA11	↑	Ovário	Cheng et al. (2005)
HOXA7	↑	Ovário	Noara et al. (2001)
HOXB7, HOXB13	↑	Ovário	Yamashita et al. (2006)
HOXA4	↑	Ovário Bexiga	Yamashita et al. (2006)
HOXC4, HOXC5, HOXC6 HOXA11, HOXC11, HOXD11	↑	Carcinoma urotelial	Cantile et al. (2003)
HOXB13	↑	Carcinoma urotelial	Marra et al. (2013)
HOXA9	↑	Carcinoma urotelial Rim	Kim et al. (2013)
HOXA11, HOXC11, HOXD11	↑	Carcinoma de células renais Melanoma	Cantile et al. (2011)
HOXC11	↑	Melanoma	Cantile et al. (2012)

Fonte: Adaptado de BHATLEKAR et al. (2014).

### 1.3 GENES HOX E CÂNCER DE MAMA

Em relação à glândula mamária, CANTILE et al. (2003b) pesquisaram a expressão dos genes HOX em tecido adulto normal e em tumores primários. Os autores encontraram expressão de 17 dos 39 HOX genes, sendo que a expressão dos chamados HOX genes torácicos (grupos 5 a 8) tendem a apresentar um padrão semelhante de expressão em tecidos normal e tumoral, sugerindo que esses genes estariam envolvidos no processo de organogênese da mama. Em contrapartida, HOX genes cervicais, aqueles dos grupos 1 a 4, e lombossacrais, dos grupos 9 a 13, tem expressões aberrantes em tumores mamários, levantando a hipótese de sua participação no processo de carcinogênese da mama.

MAKIYAMA et al. (2004) também encontraram diferenças significativas na expressão dos HOX genes entre tecido mamário normal e tumoral. Dos 39 HOX genes, 11 tinham expressão aberrante no tecido tumoral em relação ao tecido normal: HOXA1, A2, A3, A5, A9, C11, D3, D4, D8, D9 and D10, sendo que, dentre estes, apenas HOXC11 não apresentou redução de sua expressão em tumores mamários em relação ao tecido normal. Analisando diferentes tecidos tumorais, os autores encontraram ainda redução da expressão de HOXB7 em tumores com metástase linfonodal em relação às lesões sem metástase, maior expressão de HOXD12 e HOXD13 em tumores positivos para receptor de progesterona e menor expressão de HOXC5 em tumores com mutações no p53 em relação aos tumores com p53 selvagem.

HUR et al. (2014), usando oito diferentes linhagens celulares de câncer de mama e linhagem de células de tecido mamário normal, demonstraram expressão diferenciada dos HOX genes entre diferentes linhagens celulares e também entre células normais e neoplásicas. Os autores agruparam os HOX genes em 6 grupos distintos: grupo 1, composto por genes com expressão semelhante em todas as linhagens de células tumorais e de células normais em níveis similares – HOXC5, C6, C8, C11 e C13; grupo 2, formado por genes com expressão mais elevada em células normais – HOXA1 e A3; grupo 3, constituído por genes muito menos expressos em determinadas linhagens de células tumorais – HOXA4, A9, A10 e B3; grupo 4 (HOXB4, B5, B6, B7, B8, B13, C9, C10, C12, D1, D8, D10, D11 and D12), contendo genes mais expressos em mais de quatro linhagens de células tumorais; grupo 5, com genes mais expressos em menos de 3 linhagens de células tumorais em relação ao tecido mamário normal – HOXA3, D3 e D13; e grupo 6, contendo genes com regulação positiva ou negativa em determinadas linhagens de células tumorais (HOXA6, A7, A11, B2, and B9).

Alguns estudos avaliaram o envolvimento de alguns HOX genes em processos celulares relacionados à tumorigênese da mama, dentre os quais os genes HOXA1, HOXA5, HOXA9, HOXB7, HOXB9, HOXB13 e HOXD3.

CHARIOT e CASTRONOVO (1996) demonstraram que a progestina ORG 2058 induz a expressão de HOXA1 em células de tumores de mama através de experimentos usando RT-PCR semiquantitativa em culturas de células MCF7, detectando também a expressão de HOXA1 em uma variedade de células de tumores mamários, sugerindo que a expressão de

HOXA1 seja necessária para o estabelecimento de fenótipo tumoral em células de tumores mamários humanos. Os autores propõem que o gene HOXA1 seria um dos orquestradores da diferenciação das células mamárias, e alterações na expressão de HOXA1 teria um papel na progressão do câncer de mama. Analisando microarranjos para caracterizar e comparar os padrões de expressão gênica após depleção ou expressão forçada de HOXA1 em culturas de células de carcinomas mamários humanos, MOHANKUMAR et al. (2007) demonstraram que a expressão de genes envolvidos na ativação da via da MAP (*p44/42 mitogen-activated protein*) kinase, tais como GRB2, MEK1 e SDFR1, ou genes regulados por essa mesma via, como IER3, EPAS1, PCNA e catalase, são alvos de HOXA1. A expressão forçada de HOXA1 aumentou a expressão de GRB2 e MEK1, conseqüentemente aumentando a fosforilação da via MAP kinase, atividade e transcrição mediada por Elk-1. O aumento na atividade dessa via é necessário para o aumento nos eventos de proliferação, sobrevivência, oncogenicidade e transformação oncogênica mediada por HOXA1. Assim sendo, os autores concluíram que um mecanismo pelo qual HOXA1 media a transformação oncogênica de células epiteliais mamárias humanas é através da modulação da atividade da via p44/42 MAP kinase.

Em tumores mamários, o gene HOXA5 tem sido implicado em diversos eventos celulares de vital importância para a tumorigênese. RAMAN et al. (2000) demonstraram que a ausência de expressão de HOXA5 pode ser responsável pela perda de expressão de p53 em tumores mamários. Neste estudo, os autores demonstram que o gene HOXA5 é capaz de silenciar diretamente o locus da p53, evidenciando um importante

papel do HOXA5 como um gene supressor tumoral em carcinomas mamários. CHEN e SUKUMAR (2003) demonstraram ainda que HOXA5 pode induzir apoptose em células de tumores mamários em cultura, através das caspases 2 e 8, embora não fosse possível relatar diferenças na expressão de p53 mutante nestas células.

GILBERT et al. (2010) identificaram que o gene HOXA9 frequentemente encontra-se com atividade reduzida ("downregulated") em tumores mamários humanos e em linhagens celulares de tumores mamários, bem como a redução na transcrição de HOXA9 está associada com aumento da agressividade tumoral, metástases e aumento da mortalidade. Em modelos murinos e em culturas de células, a reexpressão de HOXA9 A inibiu o crescimento e reduziu a sobrevivência de células tumorais, restringindo o comportamento tumoral através da regulação positiva da expressão de BRCA1, um supressor tumoral. Estudos moleculares demonstraram que a expressão ectópica do BRCA1 tipo selvagem fenocopiou a função supressora tumoral de HOXA9, e a redução dos níveis ou da função do BRCA1 inibiu a atividade antitumoral do HOXA9. Além disso, a expressão de HOXA9 correlacionou-se com o BRCA1 em espécimes clínicos, e também com agressão tumoral em tumores negativos para receptores de estrogênio e progesterona. Tais achados indicam que o HOXA9 restringe a agressão ao tumor de mama regulando positivamente a expressão do gene BRCA1.

No segundo grupo de genes HOX, o grupo B, o gene HOXB7 demonstrou desempenhar importantes papéis, seja em relação a aumento de invasividade e metástases, ou quanto à resistência à terapia. WU et al.

(2006) demonstraram que um aumento na expressão de HOXB7 resultava na aquisição de um fenótipo de célula em transição epitélio-mesênquima, com perda de proteínas epiteliais (claudinas 1 e 7), localização aberrante de claudina 4 e E-caderina, e a expressão de proteínas mesenquimais, como vimentina e  $\alpha$ -actina. Além disso, as células que mostravam um aumento na expressão de HOXB7 também apresentaram aumento na agressividade tumoral, como migração e invasão.

HAYASHIDA et al. (2010) demonstraram que a expressão desregulada de HOXB9 contribuiu para o desenvolvimento do câncer de mama e de metástases pulmonares através da indução de vários fatores de crescimento que alteram o comportamento de células tumorais e o microambiente estromal do tumor. Os autores encontraram aumento na expressão de HOXB9 no carcinoma de mama, e que essa expressão elevada se correlaciona com alto grau de tumor. Em culturas de células, HOXB9 induziu a expressão de vários fatores angiogênicos (VEGF, bFGF, IL-8 e ANGPTL-2), bem como ErbB (anfirregulina, epirregulina e neuregulinas) e TGF- $\beta$ , que ativam suas respectivas vias, levando ao aumento da motilidade celular e aquisição de fenótipos mesenquimais. *In vivo*, o HOXB9 foi associado com a formação de tumores de maior tamanho e mais vascularizados, que evoluíram com metástase pulmonar.

O gene HOXB13 tem sido estudado como preditor de resposta ao tamoxifeno, associado ao gene IL17BR. MA et al. (2006) demonstraram que a razão entre a expressão de HOXB13 e IL17BR era um forte preditor de resposta ao tratamento com tamoxifeno como monoterapia, e ultrapassava o valor preditivo de qualquer outro método de inclusão de pacientes em

regimes terapêuticos. GOETZ et al. (2006) publicou estudo que demonstrava que a expressão de HOXB13 e IL17BR eram regulados pelos níveis de estradiol, de uma maneira dependente do RE, e que os efeitos do estradiol nestes genes eram revertidos pelo tratamento com tamoxifeno, demonstrando a importância de HOXB13 nas neoplasias dependentes de estimulação hormonal.

O gene HOXD3 é expresso em várias linhagens de células tumorais de comportamento mais agressivo, as quais exibem aumento da invasividade e maior ocorrência de metástases através da expressão de fatores associados a tais características. SHAOQIANG et al. (2013) pesquisaram a expressão de HOXD3 e integrina  $\beta$ -3 por imunohistoquímica em pacientes com câncer de mama, e encontraram que tumores com alta expressão de HOXD3 apresentaram alto grau histológico, negatividade para expressão de receptores hormonais e menor tempo de sobrevida global e livre de doença. O aumento da integrina  $\beta$ -3, molécula de adesão e sinalização celular, foi associado com aumento da expressão de HOXD3.

O gene HOXC13 correlaciona-se com o desenvolvimento de pelos, unhas e papilas filiformes. Estudos comprovaram sua alta expressão em tumores como ameloblastoma, tumores odontogênicos, melanoma e lipossarcoma. No câncer de cólon, nocaute de HOXC13 resultou em inibição do crescimento celular e atraso no ciclo celular (LUO et al. 2017). A expressão aumentada de HOXC13 em carcinomas epidermóides de pulmão é associada com piores características clínicas e menor sobrevida (LUO et al. 2017). Não há estudos sobre a associação de HOXC13 com mecanismos de tumorigênese para o câncer de mama.

## 2 JUSTIFICATIVA

Alguns dos HOX genes são envolvidos na tumorigênese do câncer de mama, tais como HOXA1, HOXA5, HOXA9, HOXB7, HOXB9, HOXB13 e HOXD3, cada um deles através de diferentes mecanismos e em diferentes etapas. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel dos membros da família HOX em termos de associação com o prognóstico do carcinoma luminal da mama, bem como sobre sua relação com outras variáveis clínico-patológicas de importância prognóstica para estes tumores ou sobre sua associação com resistência à terapia endócrina. A partir do conhecimento da associação de alguns dos HOX genes com características prognósticas e/ou preditivas do carcinoma luminal da mama, estaria lançada uma nova hipótese na tentativa de explicar eventuais diferenças de comportamento observadas entre os carcinomas luminais de mesmo grau histológico, tais como faixa etária ao diagnóstico, estadiamento ao diagnóstico, intensidade de expressão de receptores hormonais, período de recidiva e resistência à terapia endócrina. Além disso, haveria também uma nova possibilidade de alvo terapêutico, em decorrência da eventual associação da expressão de algum(ns) desses genes com fenótipo tumoral agressivo, ou ainda por associação da expressão de HOX genes com a expressão do receptor de progesterona, como o gene HOXA1, ou por associação do gene HOXB7 com MYC, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à terapia hormonal nos tumores luminais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes *HOXA1*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXB9*, *HOXB13*, *HOXC13* e *HOXD3* no carcinoma invasivo luminal da mama, e correlacionar os resultados dessa expressão com características clínico-patológicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Analisar a expressão gênica, através da técnica de RT-qPCR, dos genes *HOXA1*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXB9*, *HOXB13*, *HOXC13* e *HOXD3* em carcinomas invasivos luminais da mama e comparar as diferenças quantitativas da expressão dos genes homeobox por RT-qPCR entre tecidos tumorais e tecidos mamários normais.
- 2 Analisar a expressão por imunohistoquímica de *HOXA1*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXB9*, *HOXB13*, *HOXC13* e *HOXD3* em carcinomas invasivos luminais da mama e correlacionar os valores de expressão com características clínicas das pacientes, tais como idade ao diagnóstico e status menopausal.
- 3 Correlacionar os valores de expressão dos genes homeobox obtidos por imunohistoquímica com características das neoplasias, tais como

grau histológico e parâmetros do estadiamento patológico ao diagnóstico.

- 4 Verificar o impacto da expressão dos genes obtida por imunohistoquímica na sobrevida global e na sobrevida livre de doença.
- 5 Verificar a correlação da expressão por imunohistoquímica do gene HOXA1 com a expressão do Receptor de Progesterona.
- 6 Verificar a correlação da expressão por imunohistoquímica dos genes HOXB7 e MYC.
- 7 Comparar a expressão por RT-qPCR e por imunohistoquímica dos genes avaliados, com intuito de averiguar a correspondência dos resultados de expressão gênica por técnicas diferentes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Trata-se de estudo do tipo observacional, descritivo e retrospectivo, no qual foram avaliados prontuários de pacientes portadoras de câncer de mama obedecendo os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos.

### **4.1 CASUÍSTICA**

#### **4.1.1 Carcinomas mamários invasivos luminais**

Dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center foram selecionados 260 blocos de parafina contendo amostras de carcinomas mamários invasivos luminais (CMIL) diagnosticados entre 1990 e 2010, e 29 casos de CMIL congelados no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, além de 4 amostras obtidas a partir de tecido mamário normal.

#### **4.1.2 Critérios de inclusão**

Como critérios para inclusão no estudo, foram considerados somente pacientes do sexo feminino, que receberam o diagnóstico de neoplasia mamária entre os anos de 1990 e 2010, com diagnóstico histológico de carcinoma mamário invasivo subtipo luminal (independente do subtipo histológico e confirmado por imunohistoquímica), com pelo menos cinco anos de acompanhamento clínico após a data do diagnóstico.

#### **4.1.3 Critérios de exclusão**

Não foram incluídos no estudo pacientes do sexo masculino, ou que apresentavam lesões mamárias malignas bilaterais ao diagnóstico ou sido submetidas a qualquer tratamento oncológico prévio em relação à data do diagnóstico de neoplasia mamária.

#### **4.1.4 Características das pacientes**

Na avaliação dos prontuários médicos, foram obtidas informações sobre as pacientes, tais como idade ao diagnóstico, status menopausal, classificando as pacientes em pré e pós-menopausa, sobrevida global, definida como a porcentagem de pacientes vivos cinco anos após a data do diagnóstico, e sobrevida livre de doença, aqui considerada como o intervalo de tempo iniciado a partir da data de diagnóstico e finalizado com a ocorrência de qualquer das formas de manifestação da doença: recidiva na mesma mama ou na mama contralateral, metástase linfonodal ou metástase à distância.

#### **4.1.5 Características das neoplasias**

Em relação às neoplasias, foram consideradas a graduação histológica, graduando as neoplasias em graus 1, 2 e 3, e estadiamento patológico ao diagnóstico, classificando as categorias T, N e M de acordo com a oitava edição do sistema de estadiamento TNM, desenvolvido pela Union for International Cancer Control (UICC).

## **4.2 MICROARRANJOS TECIDUAIS (TMA, DO INGLÊS “*TISSUE MICROARRAY*”)**

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram revisadas por dois pesquisadores para delimitar a área mais significativa de cada tumor, que posteriormente foi utilizada para a construção do microarranjo tecidual (TMA, do inglês *tissue microarray*) em bloco de parafina. A construção do bloco de microarranjo tecidual foi realizada pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, da Fundação Antônio Prudente. Para a construção do TMA, duas amostras de cada neoplasia, obtidas a partir de biópsias e/ou peças cirúrgicas, com um milímetro de diâmetro cada uma delas, foram retiradas dos blocos doadores e transferidas para o bloco receptor, utilizando o aparelho Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). Foram realizados cortes de três micrômetros do bloco de microarranjos utilizando o sistema Paraffin Tape-transfer System (Instrumedics, Saint Louis, USA). Um dos cortes foi corado com H&E para confirmar a presença de tumor por microscopia de luz. As reações de imunohistoquímica foram realizadas em duas diferentes lâminas para aumentar a confiabilidade dos resultados. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro silanizadas a 8% para a realização do método imunohistoquímico.

### 4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas foram identificadas com etiquetas de códigos de barras e processadas no equipamento Benchmark ULTRA (Ventana) para desparafinização em solução de EZ PREP e recuperação antigênica por calor em solução CC1 (ultra Cell Conditionig Solution) pH alto a 96°C. A peroxidase endógena foi bloqueada por 5 minutos utilizando-se o reagente de bloqueio de peroxidase (ultraView Universal DAB Inhibitor (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), seguido de lavagem em solução de lavagem (Wash-buffer). Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos em suas respectivas diluições, especificados no Quadro 4.

**Quadro 4 - Padronização dos anticorpos dos genes HOX**

Anticorpo	Fabricante	Clone	Referência	Padronização
HOXA1	Abcam	Policlonal	ab208781	Dil: 1/50. Inc CC1: 30 min. Inc anticorpo: 32 min
HOXA5	Abcam	Policlonal	ab82645	Dil: 1/200. Inc CC1: 30 min. Inc anticorpo: 32 min
HOXA9	Abcam	Policlonal	ab92565	Dil: 1/200. Inc CC1: 30 min. Inc anticorpo: 32 min
HOXB7	Abcam	4C6	ab111018	Dil: 1/200. Inc CC1: 30 min. Inc anticorpo: 32 min
HOXB9	Abcam	Policlonal	ab66765	Dil: 1/50. Inc CC1: 30 min. Inc anticorpo: 32 min
HOXB13	Abcam	EPR17371	ab201682	Dil: 1/50. Inc CC1: 30 min. Inc anticorpo: 56 min
HOXC13	Abcam	Monoclonal	ab55251	Dil: 1/50. Inc CC1: 36 min. Inc anticorpo: 32 min
HOXD3	Abcam	Policlonal	ab22840	Dil: 1/100. Inc CC1: 8 min. Inc anticorpo: 32 min

Dil: Diluição. Inc: Incubação. min: minutos

Na sequência os cortes foram incubados com polímero HRP (HRP Multimer) com subseqüentes lavagens em tampão. Logo após foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidine (DAB) lavados em tampão e contracolorados com hematoxilina (Hematoxylin II Ventana), lavadas em solução de lavagem, água com detergente para retirada do LCS, seguida de lavagem em água corrente destilada. As lâminas foram desidratadas em álcool, xilol e montadas com Tissue-Tek film (Sakura). Após a reação, as lâminas foram cobertas por lamínula, com auxílio de Permount (Fischer). Os anticorpos que foram utilizados, após padronizada a diluição, foram: *HOXA1*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXB9*, *HOXB13*, *HOXC13*, *HOXD3* e *cMYC*. Os anticorpos para a família HOX foram adquiridos da empresa Abcam (Abcam Inc., Cambridge, MA, Estados Unidos da América). O anticorpo utilizado para detecção da expressão do MYC foi o anti-c-MYC, adquirido da empresa Ventana (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, Estados Unidos da América), clone Y69, pré-diluído.

Os resultados da expressão imunohistoquímica de receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER2 foram obtidos a partir do laudo histopatológico de cada neoplasia.

#### **4.4 ANÁLISE POR MORFOMETRIA**

As lâminas foram escaneadas utilizando-se o aparelho ScanScope XT (Aperio, Vista, CA, USA). Através do software Image Scope (Aperio, Vista, CA, USA) foram analisados por morfometria eletrônica áreas representativas

de cada neoplasia, sendo consideradas células positivas aquelas coradas de marrom no núcleo e/ou citoplasma, independente da intensidade da marcação. Os padrões de positividade dos genes da família HOX utilizados neste estudo estão sumarizados no quadro 5.

**Quadro 5** - Padrões de positividade dos anticorpos dos genes HOX

Anticorpo	Padrão de positividade
HOXA1	Nuclear/citoplasmático
HOXA5	Nuclear/citoplasmático
HOXA9	Nuclear/citoplasmático
HOXB7	Nuclear/citoplasmático
HOXB9	Nuclear/citoplasmático
HOXB13	Nuclear
HOXC13	Nuclear/citoplasmático
HOXD3	Nuclear/citoplasmático
cMYC	Nuclear

A expressão dos marcadores HOX foi considerada de acordo com o resultado numérico dos algoritmos de análise de imagens do software Image Scope (o qual é baseado no sistema RGB de cores): para o padrão de positividade nuclear/citoplasmático, o algoritmo utilizado foi o “Positive Pixel Count v9”, considerando o resultado numérico do parâmetro “Iavg”, e a mediana dos valores foi utilizada como medida de referência em relação à intensidade da expressão: valores acima e abaixo da mediana foram considerados como baixos e altos, respectivamente; e para o padrão nuclear de positividade, o algoritmo utilizado foi o “IHC ER Breast Dako clone 1D5 v1 output”, considerado o resultado dos parâmetros “Percent” e “Intensity Value”.

Em relação ao c-MYC, foram consideradas positivas as neoplasias com qualquer expressão nuclear do anticorpo.

## **4.5 RT-QPCR (DO INGLÊS “REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION”)**

### **4.5.1 Extração do RNA**

O RNA foi extraído de 29 amostras congeladas de tumor de mama e de 4 amostras de mama sem evidência de neoplasia fornecidas pelo BioBanco de Tumores do A.C.Camargo Cancer Center. As amostras foram macrodissecadas para retirada de material contaminante e o tecido congelado homogeneizado pelo equipamento Precelly®s (Carlsbad, California, USA) sendo o RNA total extraído utilizando-se o RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA).

### **4.5.2 Tratamento das amostras com DNase**

O RNA total foi incubado em solução 20 mM de Tris HCl pH 8.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl e 1U de DNase I/1ug de RNA a temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi posteriormente inativada pela adição

de 2,5 mM de EDTA e incubação a 65°C por 10 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram precipitadas por 16 horas a - 20 °C em solução de acetato de sódio 0,2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com etanol 75% e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi então seco e ressuspenso em água livre de DNase/RNase.

### **4.5.3 Análise de expressão gênica**

#### **4.5.3.1 Síntese do cDNA**

A reação de síntese do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), conforme descrição a seguir: a reação foi feita em um volume final de 20,0µl contendo 1µg de RNA total, 2,0µl de RT Buffer, 0,8µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0µl de 10X Random Primers, 1,0µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 1,0µl de inibidor de RNase. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85° C por 5 minutos em um termociclador. Os cDNAs sintetizados foram diluídos em água livre de DNase/RNase e armazenados a -20 °C.

#### **4.5.3.2 Amplificação do cDNA e análise da expressão gênica**

O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” TaqMan Universal PCR

Master Mix (2X), conforme descrição a seguir:

A reação foi feita em um volume final de 20,0 µl contendo 10ng de cDNA, 10,0µl do TaqMan Universal Master Mix (2X) (contendo MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaqGold)), 1,0µl de cada ensaio (TaqMan Gene Expression Assays, contendo a sonda e os oligonucleotídeos específicos). No quadro 6 temos a lista dos ensaios utilizados.

**Quadro 6** - Lista dos ensaios utilizados para a análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Anticorpo	Código*
HOXA1	Hs00939946_m1
HOXA5	Hs00430330_m1
HOXA9	Hs00266821_m1
HOXB7	Hs04187556_m1
HOXB9	Hs00256886_m1
HOXB13	Hs00196189_m1
HOXC13	Hs00600868_m1
HOXD3	Hs00232506_m1

\* Código do ensaio produzido pela Thermofisher

A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto, precedidos por um período de 50° C por 2 minutos e 95° C por 10 minutos. A amplificação foi feita no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Para a determinação do gene controle foi utilizada a ferramenta RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>). Esse software, através da análise do perfil de amplificação dos genes, calcula os genes com expressão mais estável no conjunto de amostras analisados. Foram testados os genes

GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase), 18S,  $\beta$ -actina,  $\beta_2$ -microglobulina, TBP (Tata box protein).

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) são obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

O nível de expressão gênica foi quantificado relativamente à expressão de um gene controle (constitutivo) e também foi normalizado de acordo com um RNA calibrador (amostras não neoplásicas). O resultado final ( $n_{\text{gene}}$ ) foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um gene em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma:

$n_{\text{gene}} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})}$ , onde  $\Delta\text{Ct}$  da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do gene estudado do valor médio de Ct do gene usado como controle.

Para a determinação de aumento ou diminuição da expressão dos genes nas amostras tumorais em comparação com as amostras não neoplásicas foi utilizado o seguinte valor:

- Diminuição de expressão: Expressão (Rq)  $\leq 0,5$
- Aumento de expressão: Expressão (Rq)  $\geq 2,0$

As amostras com expressão relativa com valores entre 0,5 e 2,0 não foram consideradas com expressão alterada em relação ao tecido não neoplásico.

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos dados foram realizadas com o auxílio dos *softwares* Excel (*Microsoft Office 2010*) e SPSS 24 (*Statistical Package for Social Sciences; IBM, USA*) no qual foram realizadas análises de sobrevida com teste log-rank, teste do qui quadrado de Pearson, teste de U de Mann-Whitney e correlação de Spearman. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para  $\alpha < 5\%$ . Para a pesquisa de associação entre a expressão dos genes e as características clínico-patológicas, foi utilizado o teste qui quadrado de Pearson. Na análise de recorrência e óbito, foram utilizadas curvas de sobrevida segundo o método de KAPLAN e MEIER (1958), com teste log-rank. O risco relativo associado com a expressão de cada um dos genes foi avaliado pelo teste de regressão múltipla de Cox (COX 1972). O teste não-paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a existência de diferenças significativas entre as medianas de variáveis de natureza ordinal: correlação da distribuição da intensidade de expressão dos genes em relação à expressão de outro marcador. Por fim, fez-se uso da correlação de Spearman para analisar a intensidade e a direção da relação entre duas variáveis considerando os valores de seus postos. Neste caso, para análise da correlação da expressão dos genes por imunohistoquímica e RT-qPCR.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS**

Na Tabela 2, podemos observar as características clínicas das 260 pacientes selecionadas para o estudo, faixa etária e status menopausal, e também de suas neoplasias: tipo e grau histológico e estadiamento.

**Tabela 2** - Características clínico-patológicas das pacientes selecionadas

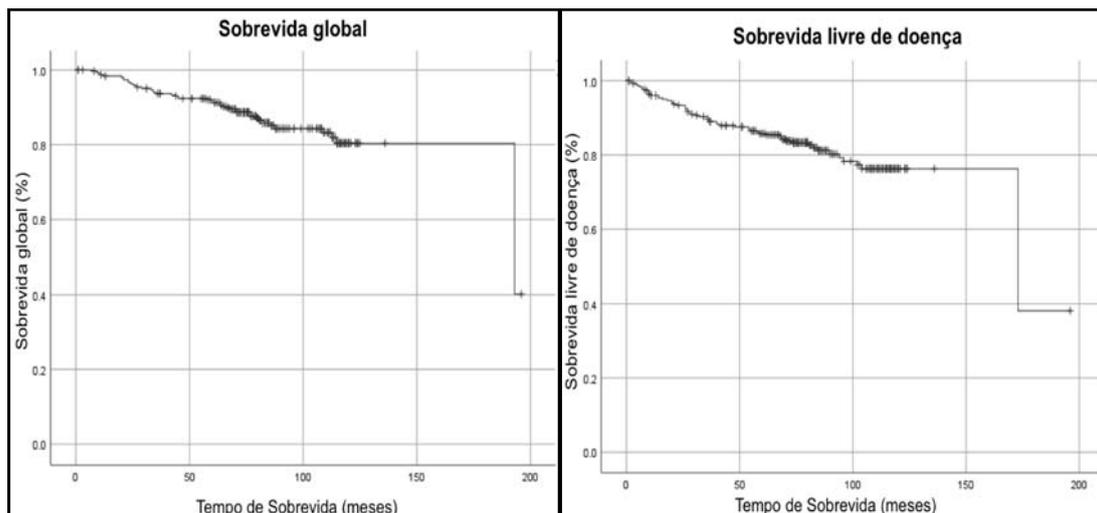
<b>Característica clínico-patológica</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Idade ao diagnóstico</b>		
Menos de 40 anos	26	10,0
40 a 49 anos	64	24,62
50 a 69 anos	139	53,46
Acima de 69 anos	31	11,92
<b>Status menopausal</b>		
Pré-menopausa	66	25,38
Pós-menopausa	194	74,62
<b>Grau histológico (SBR)</b>		
1	75	28,85
2	143	55,00
3	41	15,77
Desconhecido	1	0,38
<b>Estadio T (pT)</b>		
pT1a	8	3,08
pT1b	47	18,08
pT1c	105	40,39
pT2	79	30,38
pT3	14	5,38
pT4	5	1,92
Desconhecido	2	0,77
<b>Estadio N (pN)</b>		
pN0	168	64,62
pN1mi	6	2,30
pN1a	50	19,23
pN2a	23	8,85
pN3a	9	3,46
Desconhecido	4	1,54
<b>Estadio M (pM)</b>		
pM0	251	96,54
pM1	9	3,46

Na Tabela 3, temos as características clínicas das 29 pacientes doadoras das amostras de tumor congelado – todas fazem parte das 260 pacientes selecionadas para o estudo: faixa etária e status menopausal, bem como de suas neoplasias: tipo e grau histológico e estadiamento.

**Tabela 3** - Características clínico-patológicas das pacientes doadoras das amostras de tumor congelado

<b>Característica clínico-patológica</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Idade ao diagnóstico</b>		
Menos de 40 anos	1	3,45
40 a 49 anos	11	37,93
50 a 69 anos	14	48,28
Acima de 69 anos	3	10,34
<b>Status menopausal</b>		
Pré-menopausa	7	24,14
Pós-menopausa	22	75,86
<b>Grau histológico (SBR)</b>		
1	4	13,79
2	20	68,97
3	5	17,24
<b>Estadio T (pT)</b>		
pT1a	1	3,45
pT1b	3	10,34
pT1c	11	37,93
pT2	11	37,93
pT3	2	6,90
pT4	1	3,45
<b>Estadio N (pN)</b>		
pN0	17	58,62
pN1mi	1	3,45
pN1a	7	24,13
pN2a	2	6,90
pN3a	2	6,90
<b>Estadio M (pM)</b>		
pM0	28	96,55
pM1	1	3,45

As curvas de sobrevida global e livre de doença da amostra encontram-se representadas na Figura 12.

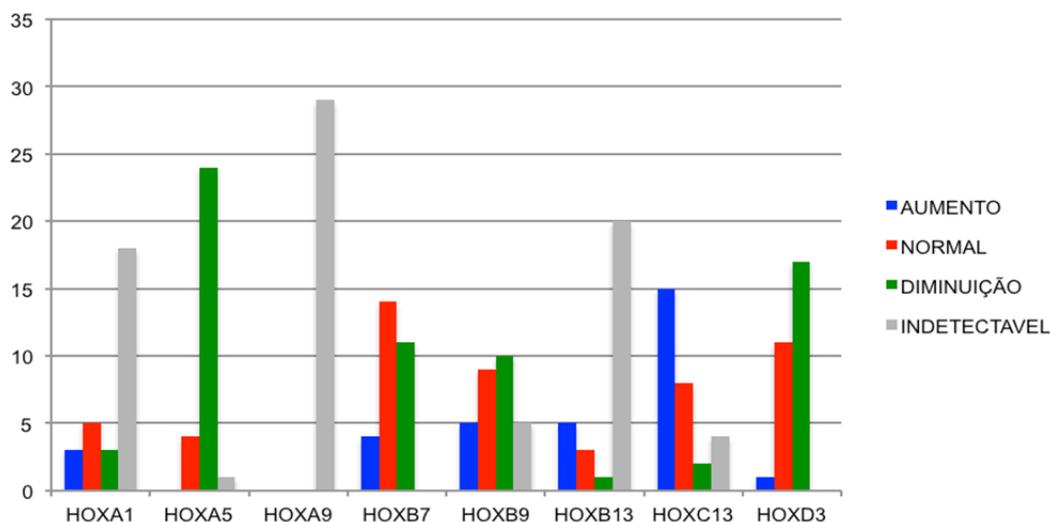


**Figura 12** - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença da amostra selecionada

## 5.2 EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

Foram selecionadas 29 amostras de tecidos mamários tumorais e 4 amostras de tecido mamário sem evidência de neoplasia para a análise de expressão gênica.

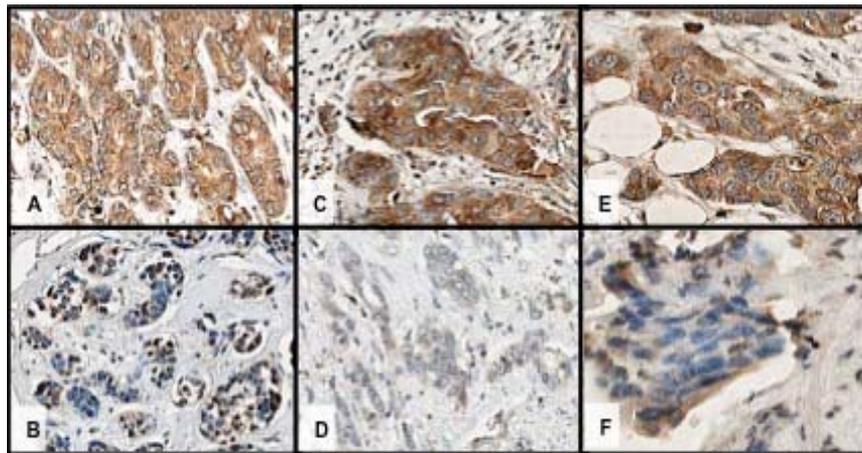
O RNA total extraído foi tratado com DNase para evitar contaminação nos experimentos. Após o tratamento, o RNA total foi quantificado produzindo um rendimento que variou de 16,53 a 364,95 ng/ $\mu$ l (Anexo 2). A Figura 13 revela os resultados da expressão gênica por RT-qPCR das amostras tumorais dos genes estudados.



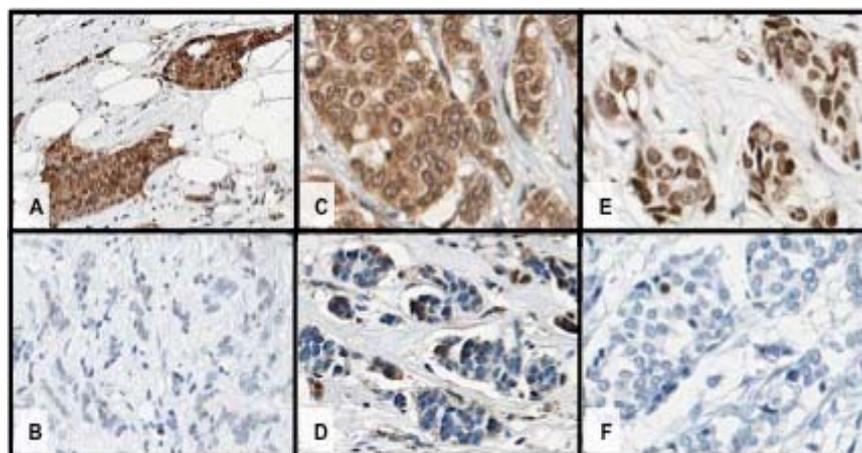
**Figura 13** – Expressão dos HOX genes por RT-qPCR em amostras de câncer de mama

### 5.3 EXPRESSÃO GÊNICA POR IMUNOHISTOQUÍMICA

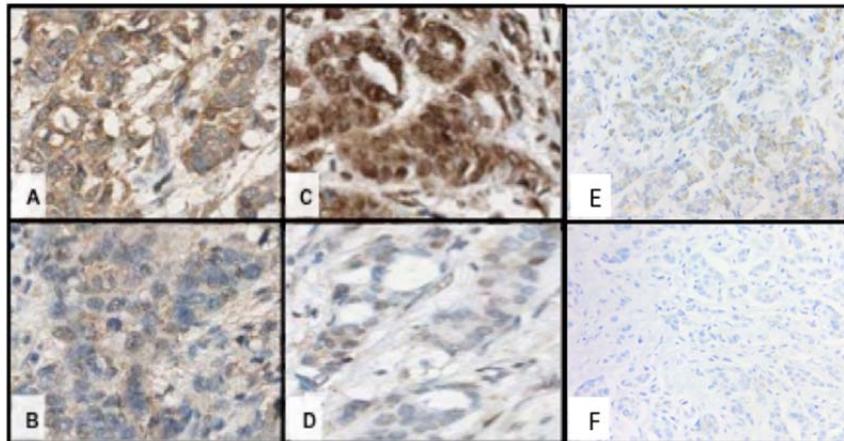
As Figuras 14, 15 e 16 revelam as variações na intensidade da marcação das células tumorais de diferentes pacientes para os genes HOX estudados, após a padronização dos anticorpos. A Figura 16 traz ainda as variações na expressão de MYC entre diferentes pacientes. Foram consideradas positivas as células que apresentaram qualquer marcação nuclear, independente da intensidade ou quantidade de células tumorais coradas.



**Figura 14** – Variações na expressão por imunohistoquímica dos genes HOXA1 (A e B), HOXA5 (C e D) e HOXA9 (E e F) em diferentes tumores.



**Figura 15** – Variações na expressão por imunohistoquímica dos genes HOXB7 (A e B), HOXB9 (C e D) e HOXB13 (E e F) em diferentes tumores.



**Figura 16** – Variações na expressão por imunohistoquímica dos genes HOXC13 (A e B), HOXD3 (C e D) e MYC (E e F) em diferentes tumores.

### 5.3.1 Expressão dos HOX genes e correlação clínico-patológica

Na Tabela 4, temos a correlação entre a expressão dos HOX genes por imunohistoquímica e as características clínicas das pacientes, tais como idade ao diagnóstico e status menopausal, e com características das neoplasias, aqui considerados o grau histológico SBR e estadiamento patológico ao diagnóstico dos parâmetros T, N e M.

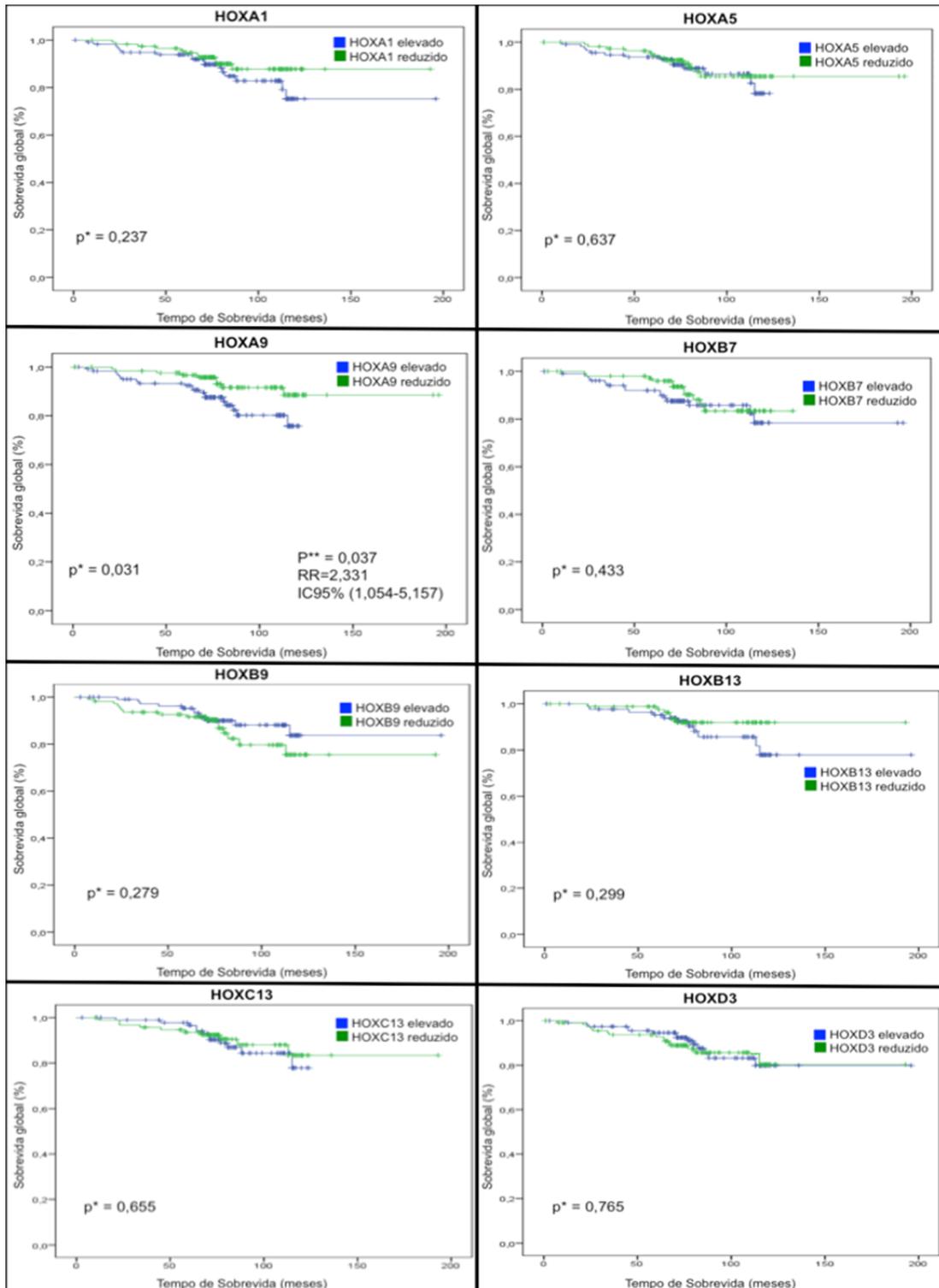
### 5.3.2 Expressão dos HOX genes e sobrevida

A relação entre a intensidade da marcação por imunohistoquímica dos HOX genes e a sobrevida global e livre de doença está representada nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

**Tabela 4 - Correlação da expressão dos HOX genes com características clínicas e tumorais**

Gene e Expressão	Faixa etária (anos)				Status menopausal		Grau histológico (SBR)				Estadiamento T				Estadiamento N				Estadiamento M				
	<40 n(%)	40-49 n(%)	50-69 n(%)	≥70 n(%)	P <sub>ré</sub> n(%)	P <sub>ós</sub> n(%)	1 n(%)	2 n(%)	3 n(%)	p <sup>*</sup>	pT1 n(%)	pT2 n(%)	pT3 n(%)	pT4 n(%)	p <sup>*</sup>	pN0 n(%)	pN1-3 n(%)	p <sup>*</sup>	pM0 n(%)	pM1 n(%)	p <sup>*</sup>		
<b>HOXA1</b>																							
Aumentado	10 (8,85)	33 (29,2)	53 (46,9)	17 (15,04)	32 (27,59)	84 (72,42)	31 (26,50)	66 (56,41)	20 (17,09)	0,937	70 (61,4)	35 (30,7)	6 (5,26)	3 (2,63)	0,980	73 (65,18)	39 (34,82)	0,846	112 (96,55)	4 (3,45)			0,97
Reduzido	13 (10,92)	29 (24,37)	66 (56,46)	11 (9,24)	30 (25,21)	88 (74,79)	34 (28,57)	65 (54,62)	20 (16,8)		74 (62,18)	36 (30,25)	7 (5,88)	2 (1,68)		79 (66,99)	40 (33,61)		115 (96,64)	4 (3,36)			
<b>HOXA5</b>																							
Aumentado	11 (9,48)	29 (25)	59 (50,86)	17 (14,66)	28 (24,14)	88 (75,86)	34 (29,57)	64 (55,65)	17 (14,78)	0,537	73 (63,48)	33 (28,7)	7 (6,09)	2 (1,74)	0,536	82 (71,93)	32 (28,07)	0,183	114 (98,28)	2 (1,72)			0,221
Reduzido	11 (9,73)	28 (24,78)	58 (51,33)	16 (14,16)	28 (25,45)	82 (74,55)	28 (25,45)	60 (54,55)	22 (20)		67 (60,91)	37 (33,63)	3 (2,73)	3 (2,73)		70 (63,94)	40 (36,36)		105 (95,45)	5 (4,55)			
<b>HOXA9</b>																							
Aumentado	13 (10,4)	26 (20,80)	67 (53,60)	19 (15,20)	30 (24)	95 (76)	33 (26,61)	72 (58,06)	19 (15,32)	0,407	74 (60,16)	38 (30,89)	7 (5,7)	4 (3,25)	0,561	77 (62,6)	46 (37,4)	0,302	119 (95,2)	6 (4,8)			0,157
Reduzido	12 (9,76)	34 (27,64)	66 (53,66)	11 (8,94)	32 (26,02)	91 (73,98)	40 (32,52)	61 (49,59)	22 (17,89)		79 (64,23)	37 (30,08)	6 (4,88)	1 (0,81)		84 (68,85)	38 (31,15)		121 (98,37)	2 (1,63)			
<b>HOXB7</b>																							
Aumentado	9 (6,49)	26 (24,53)	57 (53,77)	14 (13,21)	25 (23,58)	81 (76,42)	28 (26,67)	59 (55,24)	19 (18,09)	0,970	61 (58,1)	29 (27,62)	12 (11,43)	3 (2,85)	0,015	66 (62,86)	39 (37,14)	0,601	100 (94,34)	6 (5,66)			0,161
Reduzido	11 (10,38)	23 (21,7)	59 (55,66)	13 (12,26)	23 (22,33)	80 (77,67)	27 (26,21)	59 (54,37)	20 (19,42)		65 (62,5)	36 (34,62)	1 (0,96)	2 (1,92)		67 (66,33)	34 (33,66)		101 (98,06)	2 (1,94)			
<b>HOXB9</b>																							
Aumentado	12 (10,43)	25 (21,74)	63 (54,78)	15 (13,04)	20 (25,22)	86 (74,78)	28 (24,56)	62 (54,38)	24 (21,05)	0,305	70 (61,4)	35 (30,7)	8 (7,02)	1 (0,88)	0,452	69 (60)	46 (40)	0,203	110 (95,65)	5 (4,35)			0,296
Reduzido	10 (9,43)	33 (31,13)	52 (49,06)	11 (10,38)	26 (26,42)	78 (73,58)	29 (27,36)	63 (59,43)	14 (13,20)		62 (59,05)	34 (32,38)	5 (4,76)	4 (3,81)		71 (68,27)	33 (31,73)		104 (98,11)	2 (1,89)			
<b>HOXB13</b>																							
Aumentado	10 (11,63)	24 (27,9)	46 (52,33)	7 (8,14)	27 (31,4)	59 (68,6)	18 (20,93)	50 (58,44)	18 (20,93)	0,814	56 (65,11)	26 (30,23)	3 (3,49)	1 (1,17)	0,644	53 (60,92)	34 (39,08)	0,290	84 (97,67)	2 (2,33)			0,990
Reduzido	10 (11,49)	21 (24,14)	47 (54,02)	9 (10,34)	18 (20,89)	69 (79,31)	20 (22,99)	52 (59,77)	15 (17,24)		56 (65,11)	22 (25,58)	6 (6,98)	2 (2,33)		59 (68,6)	27 (31,4)		85 (97,7)	2 (2,3)			
<b>HOXC13</b>																							
Aumentado	7 (7,78)	24 (26,67)	51 (56,67)	8 (8,88)	24 (26,67)	66 (73,33)	26 (28,89)	52 (57,78)	12 (13,33)	0,436	52 (57,78)	28 (31,11)	8 (8,88)	2 (2,22)	0,155	50 (56,18)	39 (43,82)	0,002	86 (95,58)	4 (4,44)			0,336
Reduzido	8 (8)	21 (21)	58 (58)	15 (15)	21 (21)	79 (79)	28 (28,28)	51 (51,52)	20 (20,2)		69 (69)	27 (27)	4 (4)	-		77 (77)	23 (23)		98 (98)	2 (2)			
<b>HOXD3</b>																							
Aumentado	12 (10,26)	29 (24,79)	66 (56,41)	10 (8,55)	29 (24,79)	88 (75,21)	32 (27,35)	65 (55,56)	20 (17,09)	0,909	72 (62,07)	34 (29,31)	9 (7,76)	1 (0,86)	0,258	69 (60,53)	45 (39,47)	0,291	113 (96,58)	4 (3,42)			0,970
Reduzido	9 (7,89)	32 (26,07)	59 (51,76)	14 (12,28)	31 (27,2)	83 (72,8)	31 (27,43)	65 (57,33)	17 (15,04)		71 (62,84)	36 (31,86)	3 (2,65)	3 (2,65)		76 (67,26)	37 (32,74)		110 (96,49)	4 (3,51)			

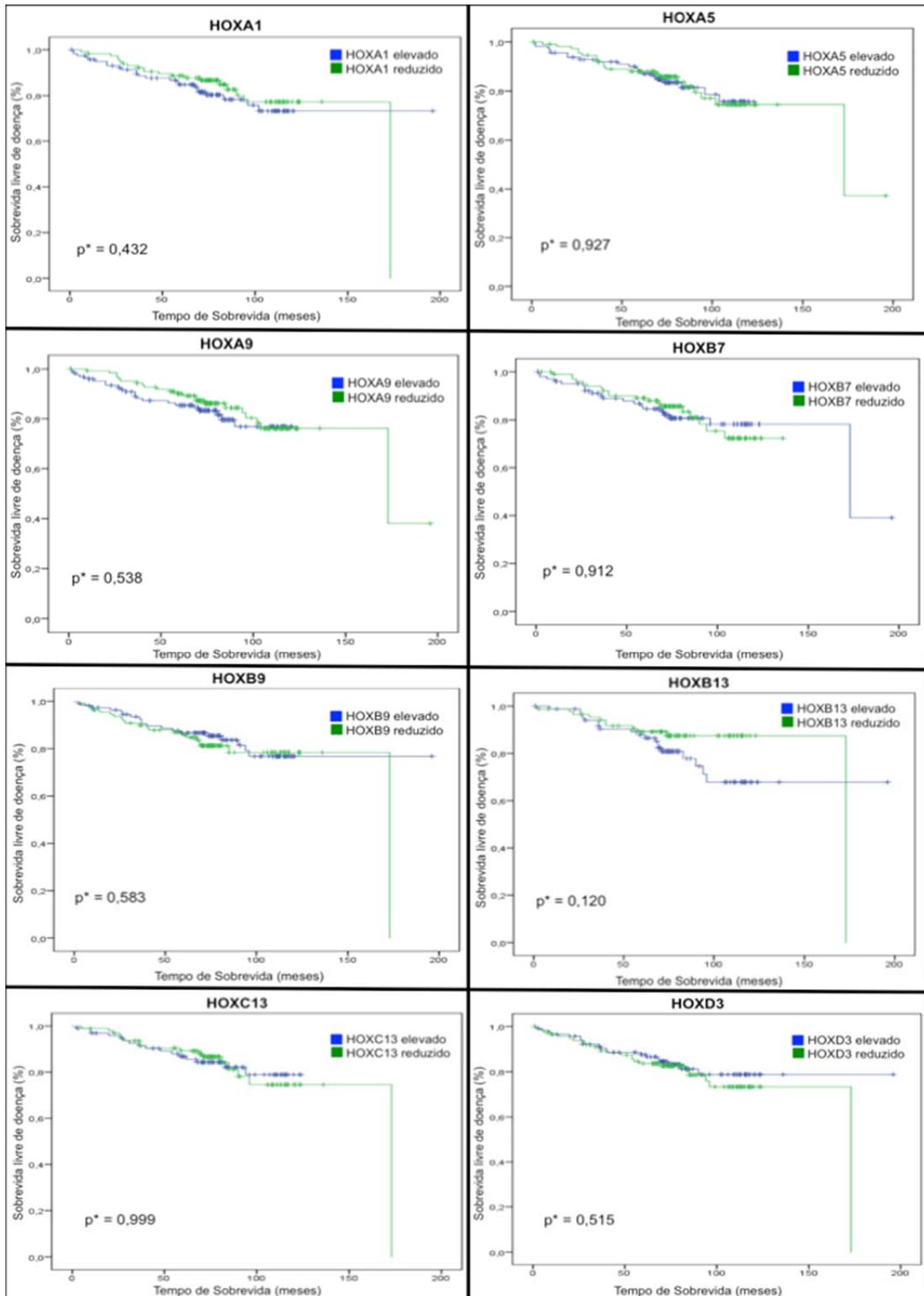
\* Teste Qui-quadrado de Pearson



\* Teste Log-rank (Mantel-Cox)

\*\* Teste de Regressão múltipla de Cox

**Figura 17** – Curvas de sobrevida global de acordo com a intensidade da expressão por imunohistoquímica dos genes Homeobox estudados



\* Teste Log-rank (Mantel-Cox)

**Figura 18** – Curvas de sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade da expressão por imunohistoquímica dos genes Homeobox

### 5.3.3 Correlação da expressão de HOXA1 e receptor de progesterona

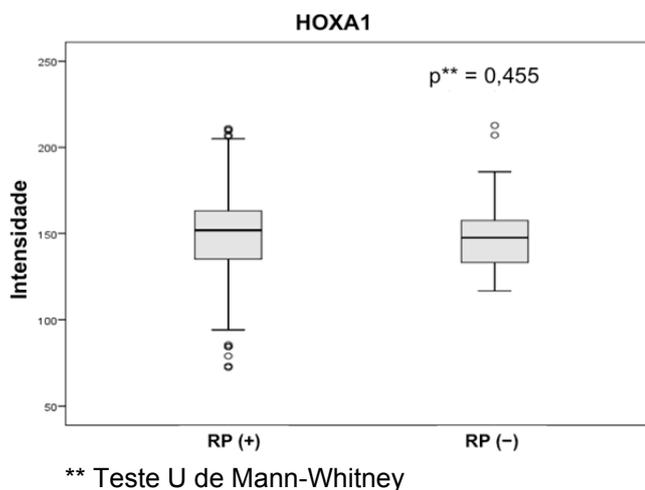
Na Tabela 5, encontramos a correlação entre a expressão de HOXA1 por imunohistoquímica e a expressão do receptor de progesterona.

**Tabela 5** - Correlação entre a expressão de HOXA1 e do Receptor de Progesterona

HOXA1	Receptor de Progesterona		p*
	Positivo n(%)	Negativo n (%)	
Elevado	97 (83,62)	19 (16,38)	0,063
Reduzido	109 (91,56)	10 (8,44)	

\* Teste Qui-quadrado de Pearson

Na Figura 19, representamos a distribuição dos valores de expressão de HOXA1 para tumores positivos e negativos para o receptor de progesterona.



**Figura 19** – Distribuição da expressão de HOXA1 em relação à expressão do receptor de progesterona

### 5.3.4 Correlação da expressão de HOXB7 e MYC

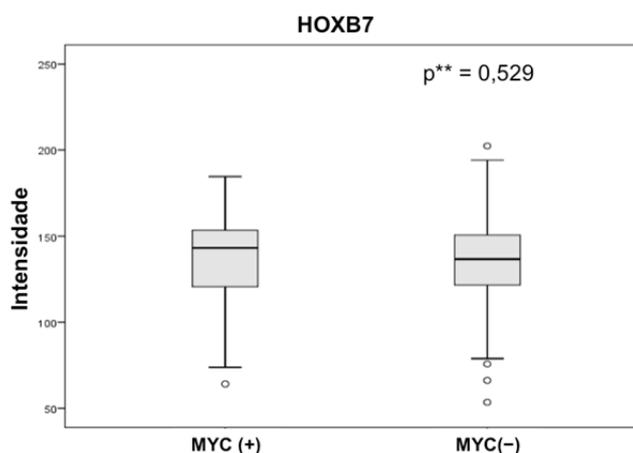
Nosso estudo pesquisou a correlação entre a intensidade da expressão de HOXB7 por imunohistoquímica com a positividade das neoplasias para o gene MYC. O resultado dessa análise encontra-se na Tabela 6.

**Tabela 6** - Correlação entre a expressão de HOXB7 e de MYC

HOXB7	MYC		p*
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Elevado	22 (34,38)	42 (65,62)	0,659
Reduzido	27 (38,03)	44 (61,97)	

\* Teste Qui-quadrado de Pearson

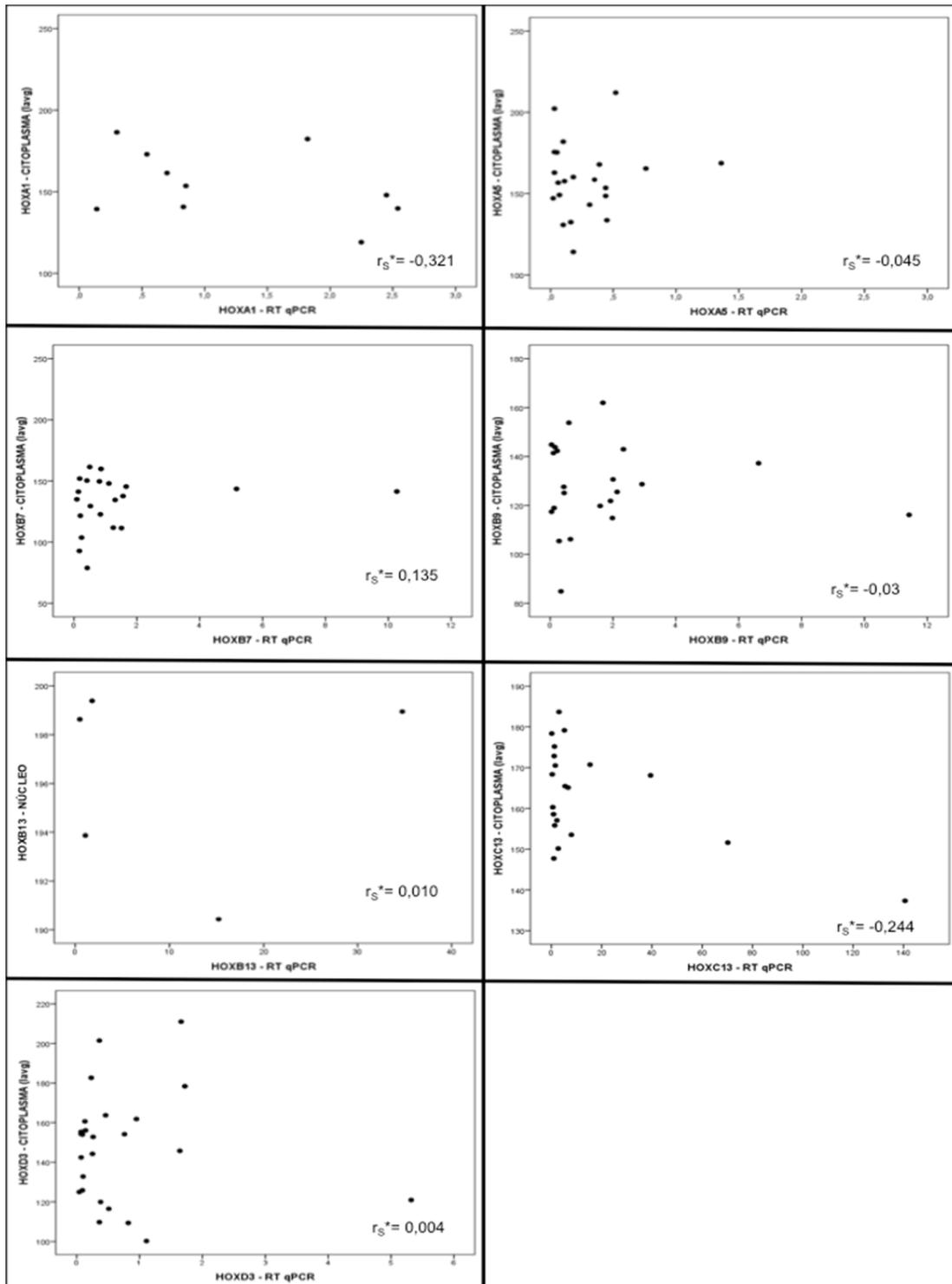
Na Figura 20, está relatada a distribuição da expressão de HOXB7 em relação à expressão de MYC pelas neoplasias.



**Figura 20** – Distribuição da expressão de HOXB7 em relação à expressão de MYC

#### **5.4 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR E POR IMUNOHISTOQUÍMICA**

Fizemos uma correlação entre a expressão dos genes pesquisados por RT-qPCR e por imunohistoquímica afim de comparar os resultados quanto às categorizações reduzido e elevado para cada um dos genes avaliados. Os resultados, para cada um dos genes estudados, encontram-se na Figura 21, excetuando-se o gene HOXA9, cuja expressão foi indetectável por RT-PCR em todas as 29 amostras disponíveis, não sendo então possível comparação da expressão de seus resultados pelas duas técnicas.



\* rô de Spearman

**Figura 21** – Correlação entre a expressão gênica por imunohistoquímica e RT-qPCR

## 6 DISCUSSÃO

Nosso estudo pesquisou a expressão gênica de alguns dos membros da família homeobox pelas técnicas de imunohistoquímica, em tecidos parafinados, e RT-qPCR, em tecidos congelados. Foram selecionadas todas as pacientes que preencheram os critérios de inclusão e não se encaixavam nos critérios de exclusão no período do estudo, sendo os números resultantes constituindo a casuística dos blocos de parafina e material congelado.

Em relação às reações por RT-qPCR, a expressão dos genes pesquisados em amostras de tecido mamário normal congelado proveniente das pacientes inseridas no estudo constituiu a referência para classificação dos resultados da expressão gênica nas amostras tumorais em normal, reduzido ou elevado, se o resultado estivesse dentro da mesma faixa de valores, abaixo ou acima, respectivamente.

A avaliação das reações de imunohistoquímica pelo software Image Scop e a distinção entre valores de expressão através do uso da mediana elimina a análise subjetiva ou estabelecimento de cutoffs não validados. Não foi estabelecida uma faixa de normalidade para os valores da expressão proteica em decorrência da grande variação observada nas amostras tumorais, geralmente semelhantes à expressão proteica no tecido mamário normal presente nas amostras tumorais.

## 6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Analisando os dados da Tabela 2, constatamos que, na amostra selecionada, a prevalência do câncer foi maior na faixa etária entre 50 e 69 anos (53,46% dos casos), e menos frequente nas pacientes com menos de 40 anos (10% dos casos). A idade ao diagnóstico variou entre 32 a 88 anos, com média de 55,36 anos. Houve maior prevalência de casos de câncer de mama em pacientes na pós-menopausa (74,62% do total de casos).

Se considerarmos as características das neoplasias, temos uma maior prevalência de tumores com grau histológico (SBR) 2 (55% do total de casos), seguidos por grau histológico 1, com 28,85% dos casos. Em relação ao estadiamento ao diagnóstico, houve predominância de tumores em estadio pT1, com pouco mais de 60% dos casos, sem metástase linfonodal (pN0), correspondendo a 64,62% do total de casos, e sem metástase à distância ao diagnóstico – pM0, totalizando 96,5% dos casos.

O tempo médio de seguimento das pacientes foi de 81,92 meses. Em relação à sobrevida da amostra, pode-se relatar uma sobrevida global em 5 anos de 93,2%, com sobrevida média de 173 meses, e uma sobrevida livre de doença de 86,36% em 5 anos. Trinta (11,5%) pacientes morreram em decorrência do câncer de mama das 260 pacientes selecionadas durante todo o tempo de seguimento, e 48 (18,46%) pacientes evoluíram com recidiva da doença no período em que foram acompanhadas. Altas taxas de sobrevida são condizentes com a predominância de tumores de mama com doença de estadiamento precoce ao diagnóstico.

## 6.2 EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

O gene HOXA9 teve sua expressão indetectável em amostras provenientes tanto de tecido tumoral quanto de tecido mamário normal, provavelmente por ter valor de expressão muito pequeno e não detectável pelo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Sem valor de expressão mensurável, esse gene foi excluído da análise de Real Time.

A expressão do gene HOXA1 não foi detectada em 18 (62,07%) amostras; em 3 (10,34%) foi observado aumento de expressão, e em outras 3 (10,34%) diminuição, e 5 (17,25%) amostras revelaram valores dentro da faixa de expressão considerada normal.

O gene HOXA5 teve expressão indetectável em apenas uma das amostras (3,45%). Aumento da expressão desse gene não foi observado em nenhuma das amostras. Em contrapartida, 24 (82,76%) amostras tumorais apresentaram redução da expressão de HOXA5, e 4 (13,79%) revelaram valores dentro da faixa de normalidade.

Todas as amostras apresentaram detecção de expressão do gene HOXB7. A diminuição da expressão do gene foi observada em 11 (37,93%) amostras. Quatro (13,79%) apresentaram expressão elevada, e 14 (48,28%) exibiram valores de expressão de HOXB7 dentro da faixa de normalidade.

HOXB9 não foi detectado em 5 (17,24%) amostras. Diminuição da expressão ocorreu em 10 (34,48%) das amostras. Esse gene teve expressão aumentada em 5 (17,24%) amostras, e 9 (31,04%) tumores apresentaram expressão de HOXB9 dentro da faixa de normalidade.

A expressão do gene HOXB13 não foi observada em 20 (68,97%) amostras, e em 5 (17,24%) foi observado aumento de expressão. A

diminuição da expressão desse gene ocorreu em 1 (3,45%) amostra, e 3 (10,34%) tumores tinham expressão desse gene dentro da faixa de normalidade.

HOXC13 não foi detectado em 4 (13,79%) amostras, e em 15 (51,72%), sua expressão foi aumentada. Apenas 2 amostras (6,90%) apresentaram diminuição da expressão desse gene, e 8 tumores (27,59%) tinham expressão de HOXC13 dentro da faixa de normalidade.

Finalmente, HOXD3 foi detectado em todas as amostras de tumor de mama. Dezesete (58,62%) tumores de mama apresentaram redução da expressão desse gene, 1 (3,45%) amostra exibiu aumento de expressão, enquanto 11 (37,93%) amostras tumorais exibiram expressão dentro da faixa de normalidade.

A tabela 7 traz um resumo do status genético de cada um dos genes avaliados por RT-qPCR.

**Tabela 7** - Distribuição do status genético dos HOX genes avaliados por RT-qPCR

Status	HOXA1 n (%)	HOXA5 n (%)	HOXA9 n (%)	HOXB7 n (%)	HOXB9 n (%)	HOXB13 n (%)	HOXC13 n (%)	HOXD3 n (%)
Indetectável	18 (62,07)	1 (3,45)	29 (100)	-	5 (17,24)	20 (68,97)	4 (13,79)	-
Aumentado	3 (10,34)	-	-	4 (13,79)	5 (17,24)	5 (17,24)	15 (51,72)	1 (3,45)
Normal	5 (17,24)	4 (13,79)	-	14 (48,28)	9 (31,04)	3 (10,34)	8 (27,59)	11 (37,93)
Reduzido	3 (10,34)	24 (82,76)	-	11 (37,93)	10 (34,48)	1 (3,45)	2 (6,90)	17 (58,62)

Considerando os genes aqui avaliados e comparando os resultados obtidos com alguns estudos de cunho semelhante, SVINGEN e TONISSEN (2003) encontraram expressão aumentada de HOXB9, HOXC13 e HOXD3 em células da linhagem MDA-MB-231, constituídas por células com maior

agressividade e menor diferenciação, em comparação à expressão em linhagens celulares constituídas por células mamárias normais ou por células de menor agressividade (linhagem MCF7); e HOXB13 e HOXC13 apresentaram expressão aumentada em células da linhagem MCF-7, formada por células com comportamento menos agressivo e bem diferenciadas. MAKIYAMA et al. (2005) encontraram redução da expressão de HOXA1, HOXA5, HOXA9, e HOXD3 em tecidos mamários tumorais em relação à expressão desses genes em tecidos mamários não tumorais. Os demais HOX genes não apresentaram diferenças significativas de expressão entre tecidos mamários tumorais e não tumorais. CANTILE et al. (2003b), avaliando diferenças qualitativas de expressão dos HOX genes entre tecido mamário normal e tumoral, encontraram predominância da expressão dos genes HOXA1, HOXA5, HOXB9, HOXB13 e HOXD3 em tecido tumoral.

HENDERSON et al. (2006) encontraram expressão de HOXA5 reduzida em amostras teciduais de tumores de mama – em mais de 80% das amostras tumorais foi encontrada expressão de HOXA5 muito reduzida ou indetectável, e expressão aumentada desse gene em culturas de células mamárias não tumorais por RT-PCR.

SHRESTHA et al. (2012) demonstraram uma maior expressão de HOXB9 por RT-qPCR em linhagens de células tumorais de mama em relação às linhagens de células de mama não neoplásicas ( $p < 0,05$ ), mais preponderantemente na linhagem MCF7, a qual consiste em células positivas para receptor de estrogênio, sugerindo ativação de HOXB9 induzida por estrogênio. Os autores encontraram ainda maior expressão de

HOXB9 por imunohistoquímica em amostras teciduais de tumores de mama em relação ao tecido mamário não tumoral de uma mesma amostra ( $p < 0,05$ ). HAYASHIDA et al. (2009) demonstrou expressão mais elevada de HOXB9 em tumores de mama em relação ao tecido mamário normal em tecido parafinado por RT-PCR.

SHAH et al. (2013), avaliando tecidos provenientes de mama não tumoral, neoplasias positivas para receptores de estrogênio e metástases à distância por RT-qPCR, encontraram aumento da expressão de HOXB13 em amostras de tumores e em metástases à distância, quando comparadas a tecido mamário não neoplásico ( $p < 0,007$ ). Os autores também encontraram uma maior expressão de HOXB13 em amostras provenientes de metástases à distância e de tumores de pacientes que evoluíram com óbito pela doença em relação àqueles tumores sem êxito letal ( $p = 0,005$ ).

### **6.3 EXPRESSÃO PROTEICA POR IMUNOHISTOQUÍMICA**

A expressão imunohistoquímica dos HOX genes nas amostras tumorais seguiu um padrão, o qual significou expressão homogênea em um mesmo tumor e variação em relação à intensidade da marcação entre diferentes neoplasias. Podemos dizer também que houve semelhança entre células tumorais e células mamárias normais contidas em uma mesma amostra em relação à quantidade de células marcadas e à intensidade da marcação.

Os padrões de expressão de todos os HOX genes, em nosso estudo,

foi nuclear/citoplasmático. Exceção foi o anticorpo anti-HOXB13, cujo padrão de expressão foi nuclear. Os genes homeobox, uma vez que quantificam fatores de transcrição nuclear, teriam, em princípio, padrão de expressão nuclear à imunohistoquímica. Porém, o padrão de expressão predominantemente citoplasmático observado na maior parte dos genes pode ser explicado, ao menos em parte, por eventuais mutações nos homeodomínios, as quais acarretariam em deslocamento da proteína para o citoplasma, ou pela policlonalidade de alguns dos anticorpos utilizados, visto que não são disponíveis nas formas monoclonais. Variações na intensidade podem ser devidas às diferentes concentrações dos homeodomínios em diferentes tumores, provocadas novamente por mutações genéticas que acarretariam redução ou aumento da expressão gênica.

Durante a realização das reações de imunohistoquímica, ocorreram perdas de amostras tumorais nos blocos de TMA provocadas por desgaste do material em decorrência do uso excessivo, resultando em diferentes quantidades de amostras tumorais que representam uma mesma situação: por exemplo, 86 amostras tumorais disponíveis com expressão elevada de HOXB13 para correlação com faixa etária, e apenas 76 para correlação com status menopausal.

### **6.3.1 Expressão dos HOX genes e correlação clínico-patológica**

Avaliando a tabela 4, constatamos que não houve associação com significância estatística entre a expressão de nenhum dos HOX genes estudados e a idade das pacientes ao diagnóstico. Na maior parte dos casos

(quase unanimidade), ocorreu distribuição semelhante entre tumores com alta ou baixa expressão dos HOX genes em relação à faixa etária ao diagnóstico: tumores com expressão alta ou baixa dos HOX genes estudados apresentaram maior prevalência na faixa etária de 50 a 69 anos, seguidos pela faixa etária de 40 a 49 anos, depois na idade acima de 60 anos, e menos frequentemente em pacientes com menos de 40 anos. Tal distribuição, porém, não foi estatisticamente associada à faixa etária das pacientes ao diagnóstico.

O mesmo pode ser dito quando correlacionamos a expressão dos HOX genes estudados com o status menopausal das pacientes. Em todas as situações avaliadas, quer as amostras tenham expressão elevada ou reduzida de quaisquer dos genes pesquisados, houve maior prevalência nas pacientes na pós-menopausa. Observa-se, ainda, uma proporção semelhante na distribuição dos tumores com alta ou baixa expressão de qualquer dos genes avaliados entre as pacientes na pré ou na pós menopausa. Considerando a associação estatística entre expressão dos HOX genes estudados e status menopausal ao diagnóstico, não houve significância.

Considerando agora as características tumorais, primeiro analisamos a correlação entre o grau histológico tumoral e a expressão dos HOX genes avaliados. Novamente, não houve significância estatística na associação entre expressão gênica e grau histológico. Tumores com expressão aumentada ou reduzida de cada um dos genes apresentaram um padrão semelhante de distribuição: mais frequentemente grau histológico 2,

seguidos de grau histológico 1, e menos frequentemente apresentaram grau histológico 3 tanto as amostras com expressão elevada quanto aquelas com expressão reduzida de cada um dos genes. A associação entre grau histológico tumoral e expressão gênica das neoplasias não mostrou significância estatística para nenhum dos genes avaliados com expressão aumentada ou reduzida nas amostras tumorais.

Em relação ao estadiamento patológico ao diagnóstico, porém, destacam-se algumas diferenças na distribuição das proporções entre os diferentes estadios do parâmetro pT e também do parâmetro pN.

Tumores com com alta ou baixa expressão de HOXB13 e com alta expressão de HOXA5 apresentaram as maiores proporções de tumores em estadio pT1. De outro modo, tumores com alta expressão de HOXC13 e HOXB7 apresentaram as menores proporções de tumores em estadio pT1. HOXB7, adicionalmente, também apresentou as maiores proporções de tumores com estadiamentos pT2 e pT3 ao diagnóstico para neoplasias com baixa e alta expressão desse gene, respectivamente, sendo a última com proporção muito discrepante em relação às neoplasias com baixa expressão genética. Tumores com alta expressão de HOXA9 e com expressão reduzida de HOXB9 exibiram maior proporção de lesões com estadiamento pT4 ao diagnóstico. Em relação ao estadiamento pT, houve significância estatística ( $p=0,015$ ) na associação desse parâmetro com a expressão de HOXB7: tumores com alta expressão de HOXB7 apresentaram menor proporção de estadiamento pT1 ao diagnóstico e maior ocorrência de estadiamento pT3 ao diagnóstico.

No tocante ao parâmetro pN, novamente observamos diferenças na distribuição das proporções entre a expressão dos genes e a ocorrência de metástases linfonodais ao diagnóstico. Lesões com alta expressão de HOXA5 e baixa expressão de HOXC13 apresentaram as maiores proporções de estadiamento pN0 ao diagnóstico. Consequentemente, neoplasias com baixa expressão de HOXA5 e baixa expressão de HOXC13 apresentaram as maiores proporções de metástase linfonodal ao diagnóstico (pN1-pN3). Os demais genes apresentaram proporções semelhantes de distribuição de suas expressões em relação à ocorrência ou não de metástases linfonodais. Houve significância estatística na associação da expressão de HOXC13 com a ocorrência de metástases linfonodais ( $p=0,002$ ,  $OR=2,61$ ): neoplasias com alta expressão de HOXC13 apresentaram maior ocorrência de metástase linfonodal ao diagnóstico, com risco 2,6 vezes maior de ocorrência de metástases linfonodais.

Quando analisamos o parâmetro metástase à distância ao diagnóstico (pM), observamos uma grande predominância de tumores sem metástase à distância ao diagnóstico (pM0) tanto para lesões com alta expressão como para tumores com baixa expressão de qualquer dos genes avaliados. O gene HOXA5, em alta expressão, e HOXA9, em baixa expressão, apresentaram uma maior prevalência de ausência de metástase ao diagnóstico. Consequentemente, lesões com baixa expressão de HOXA5 e alta expressão de HOXA9 exibiram maior prevalência de metástase à distância ao diagnóstico. A associação entre expressão dos HOX genes e ocorrência de metástases à distância ao diagnóstico não apresentou

significância estatística pra nenhum dos genes avaliados, seja com expressão elevada ou reduzida.

HENDERSON et al. (2006) pesquisaram a correlação da expressão de HOXA5 por imunohistoquímica com grau histológico em 144 amostras tumorais, e encontraram relação inversa entre expressão de HOXA5 e grau histológico, com significância estatística ( $p < 0,05$ ): tumores com baixo grau histológico apresentaram predominância de HOXA5 positivo, e tumores com alto grau histológico apresentaram predominantemente HOXA5 negativo. Os autores não encontraram associação estatisticamente significante entre a expressão de HOXA5 e do Receptor de Progesterona ( $p = 0,41$ ).

### **6.3.2 Expressão dos HOX genes e sobrevida**

Analisando os gráficos das figuras 17 e 18, vemos que houve significância estatística entre a intensidade de expressão por imunohistoquímica e a curva de sobrevida global apenas para o gene HOXA9 ( $p = 0,031$ ; RR: 2,331, IC95% [1,054-5,157],  $P = 0,037$ ): intensidade aumentada da expressão desse gene significou um risco 2,3 vezes maior de óbito por câncer de mama em relação às pacientes com tumores com expressão reduzida de HOXA9. A estimativa de sobrevida global em 60 meses para pacientes que tiveram expressão elevada de HOXA9 foi de 92,4%, enquanto para pacientes que tiveram expressão reduzida de HOXA9 foi de 96,7%. De modo geral, as curvas de sobrevida global correspondentes à expressão aumentada ou reduzida de cada um dos genes avaliados apresentaram evolução muito semelhante, todas elas se tocando em algum

momento da evolução, significando pequenas diferenças de ganho ou redução da sobrevida global, e sem significância estatística.

Porém, quando avaliamos as curvas de sobrevida livre de doença, evidenciamos que não houve significância estatística entre a intensidade da expressão dos genes avaliados e a recorrência da doença: maior ou menor intensidade de expressão desses genes não significou perda ou ganho de sobrevida livre de recorrência.

HENDERSON et al. (2006) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de HOXA5 e sobrevida global ( $p=0,51$ ) ao correlacionar os níveis de expressão de HOXA5 por imunohistoquímica em 144 amostras de tumores de mama.

GILBERT et al. (2010) encontraram associação com significância estatística ao pesquisar a associação da expressão de HOXA9 com sobrevida global e livre de doença. Pacientes com expressão mais baixa de HOXA9 apresentaram redução da sobrevida livre de doença ( $P=0,025$ ) e ocorrência mais precoce de metástases à distância ( $P=0,02$ ) em relação a todos os outros pacientes do estudo. Os autores demonstraram expressões mais baixas de HOXA9 em tumores de mama em relação ao tecido mamário normal através da pesquisa de expressão gênica em tecidos parafinados e em linhagens celulares. Houve uma relação inversa entre a expressão de HOXA9 e agressividade tumoral. Em análise multivariada, o estudo demonstrou que a expressão de HOXA9 é variável prognóstica independente em relação à sobrevida global e livre de doença em tumores negativos para o receptor de estrogênio. Em tumores que expressavam

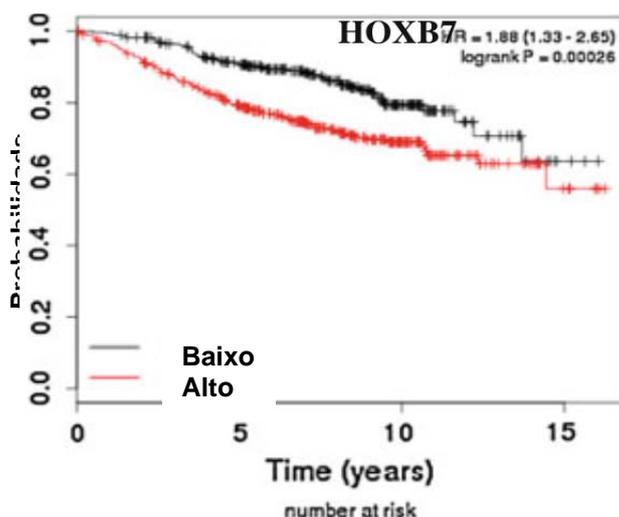
receptor de estrogênio, essa associação não foi consistente.

LIU et al. (2016), avaliando uma meta-análise com 1532 pacientes com carcinomas de diferentes órgãos, encontrou um número maior de casos com metástase linfonodal em pacientes com alta expressão de HOXB7 em relação ao grupo formado por pacientes com baixa expressão de HOXB7, com OR=2,17, IC95% (1,74-2,71,  $p < 0,00001$ ). Resultados similares foram observados na avaliação da associação da expressão de HOXB7 e metástases à distância: OR=1,77, IC95% (1,09-2,88) e  $p = 0,02$ . Como conclusão, os autores demonstraram que o aumento da expressão de HOXB7 teve associação estatisticamente significativa com metástase linfonodal e à distância em pacientes com carcinoma, sugerindo HOXB7 como um marcador molecular prognóstico para indicação de metástases.

JIN et al. (2011) encontraram associação estatisticamente significativa entre alta expressão de HOXB7 e redução da sobrevida global e livre de doença de tumores positivos para receptor de estrogênio e negativos para metástase linfonodal através da pesquisa dos níveis de RNAm de HOXB7 em dois cenários: pacientes que receberam tamoxifen em monoterapia e pacientes que não receberam terapia adjuvante ( $p=0,05$ ,  $p=0,04$ ).

Em uma metanálise que objetivou avaliar novos biomarcadores candidatos à predileção de resposta ao tamoxifen para o câncer de mama, MIHÁLY et al. (2013) incluíram genes já previamente identificados e validados em coortes clínicas, correspondendo a um total de 68 biomarcadores, entre os quais HOXB7. Através da análise ROC, os autores correlacionaram os altos níveis de expressão de HOXB7 com sobrevida livre

de doença mais curta (AUC=0,59 e  $p=1.1E-0,3$ ), e não encontraram diferenças estatisticamente significantes para sobrevida global. A curva de sobrevida livre de doença de HOXB7 nos tumores estudados é representada na Figura 22.



Fonte: Adaptado de MYHÁLE et al. (2013).

**Figura 22** – Sobrevida livre de doença de HOXB7

WU et al. (2006) identificaram expressão de HOXB7 três vezes maior em amostras de tumores de mama, e dezoito vezes maior em amostras de metástase óssea de câncer de mama em relação às amostras de tecido mamário normal através de estudo de perfil de expressão gênica em microarranjos de células epiteliais microdissecadas. Esses achados sugeriram que HOXB7 estaria envolvido na progressão do câncer de mama. Para evidenciar essa hipótese, os autores induziram a expressão de HOXB7 nas linhagens de células de tecido mamário não neoplásico (MCF10A) e células provenientes de túbulos renais caninos (MDCK). Células que

apresentavam aumento da expressão de HOXB7 exibiram características morfológicas, imunofenotípicas e moleculares de células mesenquimais, suportando a ideia de que HOXB7 desempenha um importante papel na progressão do câncer de mama através da indução da transformação epitélio-mesênquima.

SEKI et al. (2012) pesquisaram a associação da expressão por imunohistoquímica de HOXB9, o qual confere invasividade, maior capacidade metastática e proliferação vascular no câncer de mama, com características clínico-patológicas em amostras teciduais de 141 pacientes. Os autores encontraram associação com significância estatística entre a expressão positiva de HOXB9 e o grau nuclear mais elevado das neoplasias ( $p < 0,001$ ), maior estadiamento T ( $p = 0,001$ ) e N ( $p = 0,001$ ) ao diagnóstico e também com status negativo dos receptores hormonais ( $p < 0,001$ ) e positivo de HER2 ( $p = 0,031$ ). Curvas de sobrevida também mostraram diferenças importantes: pacientes com expressão positiva de HOXB9 apresentaram redução de sobrevida global e livre de doença em relação aos pacientes com expressão negativa. Análises univariada e multivariada revelaram que a expressão de HOXB9 é fator prognóstico independente na sobrevida livre de doença do câncer de mama.

SHAH et al. (2013) demonstraram que expressão elevada de HOXB13 em tumores positivos para o receptor de estrogênio está correlacionada com resistência ao tamoxifen. Os autores demonstraram maior expressão de HOXB13 por RT-qPCR em tecidos provenientes de metástase de câncer de mama e de neoplasias primárias em relação ao

tecido mamário normal, e maior expressão desse gene em tecidos provenientes de pacientes que evoluíram com êxito letal em relação aos pacientes que não evoluíram para óbito, sugerindo que HOXB13 está envolvido no processo de disseminação e na sobrevida do câncer de mama. Avaliando a correlação da expressão concomitante de HOXB13 e IL6 no processo de resistência ao tamoxifen, foram analisados dados referentes a 288 pacientes com tumores positivos para receptor de estrogênio. Pacientes com alta expressão combinada de HOXB13 e IL6 evoluíram com redução da sobrevida global em relação à elevação isolada de HOXB13 ou de IL6, sustentando a participação de HOXB13 e IL6 no processo de agressividade da doença e da resistência ao tamoxifen em tumores positivos para receptores hormonais.

SHAOQIANG et al. (2012) pesquisaram o impacto da expressão de HOXD3 por imunohistoquímica em câncer de mama. Em relação a características como idade ao diagnóstico, status menopausal, grau histológico, estadiamento T, N e M ao diagnóstico, status dos receptores hormonais e tratamento adjuvante, os autores encontraram associação estatística entre a expressão de HOXD3 e grau histológico ( $P=0,02$ ), com maior expressão de HOXD3 em tumores de grau histológico 3, e entre uma maior expressão de HOXD3 e negatividade para expressão de ambos os receptores hormonais. Não houve associação estatística entre a expressão de HOXD3 e os demais parâmetros clínicos citados. Das 119 pacientes incluídas no estudo, aquelas com expressão de HOXD3 evoluíram com menor sobrevida global ( $P<0,001$ ) e livre de doença ( $P=0,001$ ) em relação

àquelas com HOXD3 negativo. Considerando o estadió clínico, pacientes com doença em estadios II e III e com tumores positivos para HOXD3 evoluíram com menor sobrevida global e livre de doença, inclusive, pacientes com neoplasias em estadió clínico II e positivas para HOXD3 tiveram pior sobrevida global e livre de doença em relação às pacientes com estadió III ao diagnóstico. Análise univariada revelou pior prognóstico para tumores com expressão de HOXD3, dentre outros fatores, e análise multivariada demonstrou o status da expressão de HOXD3 como fator de piora prognóstica.

### **6.3.3 Correlação da expressão de HOXA1 e receptor de progesterona**

A partir da análise da tabela 5, vemos que neoplasias com expressão reduzida de HOXA1 apresentaram maior proporção de positividade para o receptor de progesterona em relação às lesões com expressão aumentada de HOXA1. Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de HOXA1 e a expressão do receptor de progesterona ( $p=0,063$ ). Na Figura 20, novamente não encontramos significância estatística entre a distribuição da expressão de HOXA1 e o status do receptor de progesterona.

O estudo de Charriot e Castronovo (1996) demonstrou, através da pesquisa da expressão de RNAm de HOXA1 em células da linhagem MCF7 por RT-PCR semi-quantitativa, que a expressão de transcritos de HOXA1 é aumentada em células que foram tratadas com progestina ORG 2058, levantando a hipótese de que HOXA1 pode ter expressão modulada por esteroides como estrogênio e progesterona, e que ainda há de ser

identificado um potencial elemento da região promotora de HOXA1 capaz de interagir com o receptor de progesterona.

#### **6.3.4 Correlação da expressão de HOXB7 e MYC**

O gene HOXB7 é um dos envolvidos na resistência ao Tamoxifen pelo câncer de mama. Espera-se que tumores com altos níveis de expressão de HOXB7 apresentem maior resistência à terapia hormonal e evoluam com recidiva mais precoce em relação àqueles com baixos níveis de expressão de HOXB7. A tabela 6 revelou proporções semelhantes entre a distribuição da expressão de HOXB7 em relação à positividade para MYC: neoplasias com expressão elevada ou reduzida de HOXB7 apresentaram mais frequentemente ausência de expressão de MYC, em proporções semelhantes, com ligeira predominância de negatividade para expressão de MYC em tumores com expressão elevada de HOXB7. A associação entre expressão de HOXB7 e de MYC em tumores luminais não foi estatisticamente significativa ( $p=0,659$ ). Mais uma vez, não foi observada significância estatística entre a distribuição da expressão de HOXB7 em relação à expressão de MYC, como representado na Figura 20.

Para JIN et al. (2015), a hiperexpressão de HOXB7 em células tumorais da mama confere resistência ao tratamento com Tamoxifen em tumores positivos para receptor de estrogênio através do aumento na expressão e sinalização do EGFR, da ativação direta desse receptor de tirosina-quinase. Realizando estudos com culturas de células, os autores demonstraram que a elevação da expressão de HOXB7 seria um dos passos-chave envolvidos

na aquisição e manutenção de resistência dos tumores aos moduladores seletivos do receptor de estrogênio, conferindo a essas lesões um fenótipo mais agressivo e sugerindo que HOXB7 poderia se tornar um alvo terapêutico para tumores de mama resistentes ao tamoxifen. JIN et al. (2015) referem que a expressão de EGFR é estimulada através da ligação direta de HOXB7 à região promotora do EGFR, e que HOXB7 funciona como um cofator ao receptor alfa de estrogênio, ER $\alpha$ , provocando expressão aumentada de múltiplos genes-alvo do receptor de estrogênio, incluindo HER2, em células resistentes ao tamoxifen. Os autores encontraram ainda os genes miR-196a e MYC como reguladores da expressão de HOXB7. HOXB7 e ER $\alpha$  juntos estimulam o HER2, o qual fosforila MYC e este suprime miR-196a. A supressão de miR-196a perpetua a influência de HOXB7: sabe-se que o aumento da expressão de miR-196a reduz HOXB7 e ressensibiliza as células ao tamoxifen.

#### **6.4 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR E POR IMUNOHISTOQUÍMICA**

Para tal comparação, tivemos necessariamente que utilizar apenas amostras com expressão pareada por imunohistoquímica e por RT-qPCR e verificar se a categorização foi a mesma para ambas as situações. Dos 260 casos selecionados para esse estudo, apenas 29 amostras encontravam-se disponíveis para estudo no banco de tumores do A.C. Camargo Cancer Center. Considerando ainda as perdas ocorridas durante a realização das

reações, tanto por RT-qPCR quanto por imunohistoquímica, e também o fato de algumas amostras (ou mesmo todas, no caso do gene HOXA9) apresentarem expressão indetectável para alguns dos genes avaliados, essa análise foi prejudicada em decorrência da reduzida quantidade de amostras que apresentaram expressão gênica concomitante através das duas técnicas. Destaque-se, ainda, as diferentes metodologias empregadas para análise dos resultados das duas técnicas, segundo as quais partíamos de valores de referência de normalidade no caso do RT-qPCR, categorizando a expressão das amostras em elevado, normal e reduzido (sem considerar aquelas indetectáveis pelo método) e de uma categorização em elevado e reduzido separados pela mediana dos valores de expressão, como ocorreu na análise por imunohistoquímica. Assim sendo, elaboramos um gráfico de dispersão com o intuito de verificar se uma mesma amostra que apresentou valores de expressão classificados como aumentado ou reduzido por imunohistoquímica também o fez por RT-qPCR.

A partir da análise da figura, por meio da correlação de Spearman, conclui-se que há uma correlação negativa fraca entre a expressão de HOXA1 por imunohistoquímica e por RT-qPCR ( $r_s = -0,321$ ); não há correlação entre a expressão de HOXA5 por imunohistoquímica e por RT-qPCR, ou seja, há fortes evidências para se afirmar que os dados estão distribuídos aleatoriamente ( $r_s = -0,045$ ); há uma correlação positiva muito fraca entre a expressão de HOXB7 por imunohistoquímica e por RT-qPCR ( $r_s = 0,135$ ); não há correlação entre a expressão de HOXB9 por imunohistoquímica e por RT-qPCR, ou seja, há fortes evidências que os

dados estão distribuídos aleatoriamente ( $r_s=-0,03$ ); há uma correlação positiva muito fraca entre HOXB13 expresso por imunohistoquímica e por RT-qPCR ( $r_s=0,10$ ); há uma correlação negativa fraca entre as expressões por imunohistoquímica e por RT-qPCR de HOXC13 ( $r_s=-0,244$ ); não há correlação entre as expressões de HOXD3 por imunohistoquímica e por RT-qPCR, com fortes evidências que os dados estejam distribuídos aleatoriamente ( $r_s=0,004$ ).

## 7 CONCLUSÕES

Procuramos estudar a expressão de alguns dos genes reguladores da diferenciação celular e correlacionar com fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama, especificamente o subtipo luminal. Para tal, utilizamos uma amostra populacional considerável em número de pacientes e com tempo médio de seguimento acima de 80 meses, resultando em retratação fidedigna da literatura do câncer de mama luminal, além de duas técnicas de pesquisa de expressão: RT-qPCR e imunohistoquímica, as quais consistem em pesquisa da expressão de RNAm e proteínas gênicas, respectivamente. Obtenção dos resultados através de softwares elimina a subjetividade durante sua interpretação. Correlação com aspectos clínicos, histopatológicos e resistência endócrina foram discutidos. Não foram estudados todos os genes da família HOX por limitações de recursos financeiros, e apenas o subtipo luminal foi discutido em decorrência de muitas variações no comportamento dessa neoplasia, na tentativa de melhor elucidar parte da heterogeneidade tumoral observada no câncer de mama.

Após a realização desse estudo, podemos afirmar as seguintes conclusões:

- 1 A pesquisa de expressão gênica pela técnica RT-qPCR revelou que HOXC13 teve expressão predominantemente aumentada nas amostras tumorais; HOXA5, HOXB9 e HOXD3 apresentaram expressão predominantemente reduzida; HOXB7 teve sua expressão

mais frequentemente dentro dos valores de normalidade nas amostras de tumor congelado; e HOXA9 (este em todas as amostras tumorais), HOXA1 e HOXB13 foram mais frequentemente indetectáveis nas amostras de câncer de mama em relação às amostras de tecido mamário normal.

- 2 Não encontramos associação com significância estatística entre a expressão proteica de qualquer dos genes estudados e as características clínicas idade ao diagnóstico e status menopausal.
- 3 O grau histológico das neoplasias não foi associado com a expressão proteica de nenhum dos genes estudados. Porém, em relação ao estadiamento patológico, observamos que o aumento na expressão de HOXB7 foi associado com doença mais avançada ao diagnóstico: maior frequência de estadios pT3 e pT4 em relação aos demais genes ( $p=0,015$ ); e expressão aumentada de HOXC13 foi associada com maior ocorrência de metástases linfonodais ao diagnóstico e risco relativo 2,61 vezes maior em relação às neoplasias com expressão reduzida de HOXC13 ( $p=0,002$ ; OR: 2,61). A ocorrência de metástases à distância não foi associada com o status da expressão proteica dos genes estudados.
- 4 No tocante à sobrevida das pacientes, apenas o aumento na expressão proteica de HOXA9 foi associado com redução da sobrevida global ( $p=0,031$ ; RR: 2,331, IC 95% [1,054-5,157],  $P=0,037$ ). A sobrevida livre de doença não foi associada com a expressão proteica de nenhum dos genes pesquisados.

- 5 A expressão do Receptor de Progesterona por imunohistoquímica não foi associada com a expressão proteica de HOXA1.
- 6 Expressão proteica elevada ou reduzida de HOXB7 não foi associada à expressão de MYC.
- 7 A correlação entre a expressão gênica por RT-qPCR e a expressão proteica por imunohistoquímica foi inexistente para os genes HOXA5 e HOXB9, negativa fraca se consideramos os genes HOXA1 e HOXC13, e positiva muito fraca em relação aos genes HOXB7 e HOXB13, possivelmente pelo baixo número de amostras de tumor congelado disponíveis para comparação.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe M, Hamada J, Takahashi O, et al. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. **Oncol Rep** 2006; 15:797-802.

Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 144:1-10.

Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers. **J Mol Med** 2014; 92:811-23.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Cantile M, Schiavo G, Franco R, et al. Expression of lumbosacral HOX genes, crucial in kidney organogenesis, is systematically deregulated in clear cell kidney cancers. **Anticancer Drugs** 2011; 22:392-401.

Cantile M, Cindolo L, Napodano G, Altieri V, Cillo C. Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. **Oncogene** 2003a; 22:6462-8.

Cantile M, Pettinato G, Procino A, Feliciello I, Cindolo L, Cillo C. In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer. **Eur J Cancer** 2003b; 39:257-64.

Carè A, Silvani A, Meccia E, et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. **Mol Cell Biol** 1996; 16:4842-51.

Carè A, Felicetti F, Meccia E, et al. HOXB7: A key factor for tumor-associated angiogenic Switch. **Cancer Res** 2001; 61:6532-9.

Chariot A, Castronovo V. Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 1996; 222:292-7.

Chen H, Chung S, Sukumar S. HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases 2 and 8. **Mol Cell Biol** 2003; 24:924-35.

Chen H, Sukumar S. Role of homeobox genes in normal mammary gland development and breast tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2003; 8:159-75.

Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. **Nat Med** 2005; 11:531-7.

Christensen KL, Patrick AN, McCoy EL, Ford HL. The six family of homeobox genes in development and cancer. **Adv Cancer Res** 2008; 101:93-126.

Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. **Int J Cancer** 1992; 51:892-7.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. **J Cell Physiol** 2001; 188:161-9.

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015. **Ann Oncol** 2015; 26:1533-46.

Costa BM, Smith JS, Chen Y, et al. Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K Inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. **Cancer Res** 2010; 70:453-62.

Cox DR. Regression models and life-tables. **J Royal Stat Soc Series B (Methodological)** 1972; 34:187-220.

Desantis CE, Ma J, Goding Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics 2017, racial disparity in mortality by state. **Ca: A Cancer J Clin** 2017; 67:439-48.

De Vita G, Barba P, Odartchenko N, et al. expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. **Eur J Cancer** 1993; 29A:887-93.

Eliyatkın N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. **J Breast Health** 2015; 11:59-66.

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; 5:403-10.

Freitas-Junior R, Gonzaga CM, Freitas NM, Martins E, Dardes Rde C. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics** 2012; 67:731-7.

Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. **Cancer Cell** 2003; 4:361-70.

Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, et al. HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. **J Clin Invest** 2010; 120:1535-50.

Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, et al. A Two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17b receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. **Clin Cancer Res** 2006; 12:2080-7.

Gonzaga CM, Freitas-Junior R, Souza MR, Curado MP, Freitas NM. Disparities in female breast cancer mortality rates between urban centers and rural areas of Brazil: ecological time-series study. **Breast** 2014; 23:180-7.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. **J Pathol** 2005; 205:154-71.

Haria D, Naora H. Homeobox gene deregulation: impact on the hallmarks of cancer. **Cancer Hallm** 2013; 1:67-76.

Hayashida T, Takahashi F, Chiba N, et al. HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 107:1100-5.

Henderson GS, van Diest PJ, Burger H, Russo J, Raman V. Expression pattern of a homeotic gene, HOXA5, in normal breast and in breast tumors. **Cell Oncol** 2006; 28:305-13.

Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC Biol** 2007; 5:47-75.

Hur H, Lee JY, Yun HJ, Park BW, Kim MH. Analysis of HOX gene expression patterns in human breast cancer. **Mol Biotechnol** 2013; 56:64-71.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. The Global Cancer Observatory-GLOBOCAN. **Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, worldwide, females, all ages**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2OrtPbG>>. [2019 mar 27].

Izpisua-Belmonte JC, Duboule D. Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. **Dev Biol** 1992; 152:26-36.

Jin K, Kong X, Shah T, et al. The HOXB7 protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 109:2736-41.

Jin K, Park S, Teo WW, et al. HOXB7 is an ER $\alpha$  cofactor in the activation of her2 and multiple er target genes leading to endocrine resistance. **Cancer Discov** 2015; 5:944-59.

Jin K, Sukumar S. A pivotal role for HOXB7 protein in endocrine resistant breast cancer. **Oncoscience** 2015; 2:917-9.

Kaminska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny** 2015; 14:196-202.

Kanai M, Hamada J, Takada M, et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. **Oncol Rep** 2010; 23:843-51.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:457-81.

Ko SY, Barengo N, Ladanyi A, et al. HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts. **J Clin Invest** 2012; 122:3603-17.

Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. HOX GENES: seductive science, mysterious mechanisms. **Ulster Med J** 2006; 75:23-31.

Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol** 2012; 13:95-102.

Lindsley DL, Grell EH. **Ultrabithoorax**. Available from: <http://cgslab.com/cgs1/phenotypes.cgi?n=143> [2019 jan 12]

Liu FT, Ou YX, Zhang GP, Qiu C, Luo HL, Zhu PQ. HOXB7 as a promising molecular marker for metastasis in cancers: a meta-analysis. **Onco Targets Ther** 2016; 9:2693-9.

Luo J, Wang Z, Huang J, et al. HOXC13 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma via repressing transcription of CASP3. **Cancer Sc** 2017; 109:317-29.

Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:6348-52.

Makiyama K, Hamada J, Takada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. **Oncol Rep** 2005; 13:673-9.

Mihály Z, Kormos M, Lániczky A, et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 140:219-32.

Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, et al. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. **Cancer Res** 2003; 63:5879-88.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2015: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Mohankumar KM, Xu XQ, Zhu T, et al. HOXA1-stimulated oncogenicity is mediated by selective upregulation of components of the p44/42 MAP kinase pathway in human mammary carcinoma cells. **Oncogene** 2007; 26:3998-4008.

[NCCN] ational Comprehensive Cancer Network. **Clinical practice guidelines-v.1**. 2016. Available from: <URL:<https://bit.ly/2EhcLBt/breast.pdf>> [2018 jan 28].

Nunes FD, de Almeida FC, Tucci R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. **Pesqu Odontol Bras** 2003; 17:94-8.

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

Phenotypes. Available from: <URL:[http://www.unc.edu/depts/our/hhmi/hhmi--ft\\_learning\\_modules/fruitflymodule/phnotypes.html](http://www.unc.edu/depts/our/hhmi/hhmi--ft_learning_modules/fruitflymodule/phnotypes.html)> [2018 out 13]

Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. **Mol Genet Metab** 2014; 111:4-15.

Raman V, Martensen SA, Reisman D, et al. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. **Nature** 2000; 405:974-8.

Rose PW, Prlić A, Altunkaya A, et al. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. **Nucleic Acids Res** 2017; 45:D271-D81.

Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. **Eur J Cancer** 2005; 41:2428-37.

Seki H, Hayashida T, Jinno H, et al. HOXB9 expression promoting tumor cell proliferation and angiogenesis is associated with clinical outcomes in breast cancer patients. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:1831-40.

Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol** 2013; 26 Suppl 5:v8-30.

Shah N, Jin K, Cruz LA, et al. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ER and Inducing IL-6 expression. **Cancer Res** 2013; 73:5449-58.

Shaoqiang C, Yue Z, Yang L, et al. Expression of HOXD3 correlates with shorter survival in patients with invasive breast cancer. **Clin Exp Metastasis** 2013; 30:155-63.

Shrestha B, Ansari KI, Bhan A, Kasiri S, Hussain I, Mandal SS. Homeodomain-containing protein HOXB9 regulates expression of growth and angiogenic factors, facilitates tumor growth in vitro and is overexpressed in breast cancer tissue. **FEBS J** 2012; 279:3715-26.

Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med** 2009; 360:790-800.

Svingen T, Tonissen KF. Altered HOX gene expression in human skin and breast cancer cells. **Cancer Biol Ther** 2003; 2:518-23.

Tabuse M, Ohta S, Ohashi Y, et al. Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells. **Mol Cancer** 2011; 10:60-73.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. **Exp Cell Res** 2004; 293:144-53.

Tiberio C, Barba P, Magli MC, et al. Hox gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. **Int J Cancer** 1994; 58:608-15.

Topisirovic I, Kentsis A, Perez JM, Guzman ML, Jordan CT, Borden KL. Eukaryotic translation initiation factor 4E activity is modulated by HOXA9 at multiple levels. **Mol Cell Biol** 2005; 25:1100-12.

Torre, Lindsey A., et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer J Clin** 2015; 65:87-108.

Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **J Pathol** 2008; 216:141-50.

Wu X, Chen H, Parker B, et al. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Res** 2006; 66:9527-34.

Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Res** 2006; 66:889-97.

## Anexo 1 - Estadiamento patológico do câncer de mama

### pTNM – 8ª EDIÇÃO PARA CANCER DE MAMA

#### Tumor primário (Carcinoma invasivo) (pT)

- . pTX: Tumor primário não pode ser avaliado
- . pT0: Sem evidência de tumor primário
- . pTis (CDIS): Carcinoma ductal in situ
- . pTis (CLIS): Carcinoma Lobular carcinoma in situ
- . pTis (Paget): Doença de Paget do mamilo não associada com carcinoma invasivo e/ou carcinoma in situ do parênquima mamário subjacente
- . pT1: Tumor com dimensão  $\geq 1,0$  mm e  $\leq 2,0$  cm
  - pT1mi: Tumor  $\leq 1,0$  mm na maior dimensão (microinvasão)
  - pT1a: Tumor  $>1,0$  mm e  $\leq 5,0$  mm na maior dimensão
  - pT1b: Tumor  $>5,0$  mm e  $\leq 10,0$  mm na maior dimensão
  - pT1c: Tumor  $>10,0$  mm e  $\leq 20,0$  mm na maior dimensão
- . pT2: Tumor  $>20,0$  mm e  $\leq 50,0$  mm na maior dimensão
- . pT3: Tumor  $>50,0$  mm na maior dimensão
- . pT4: Tumor de qualquer dimensão com extensão direta para parede torácica e/ou para pele (ulceração ou nódulos cutâneos)
  - pT4a: Extensão para parede torácica, não incluindo apenas aderência/invasão do músculo peitoral
  - pT4b: Ulceração e/ou nódulos satélites ipsilaterais e/ou edema (incluindo aspecto em “casca de laranja”) cutâneos, sem critérios para carcinoma inflamatório
  - pT4c: Presença de pT4a e pT4b
  - pT4d: Carcinoma inflamatório

**Nota:** Invasão da derme isoladamente não qualifica o tumor como pT4

#### Linfonodos regionais (pN) (baseado no número de linfonodos contidos no espécime, sem a realização de estudos imunohistoquímicos e/ou moleculares)

- . pNX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados (previamente removidos ou não enviados para estudo histopatológico)
- . pN0: Ausência de metástases linfonodais identificadas histologicamente
  - pN0 (i-): Ausência de metástases linfonodais identificadas histologicamente, com estudo imunohistoquímico negativo
  - pN0 (i+): Células malignas em linfonodos regionais medindo até 0,2 mm e contendo até 200 células (detectadas por HE ou imunohistoquímica)
  - pN0 (mol-): Ausência de metástases linfonodais identificadas histologicamente, com estudo molecular negativo (reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa [RT-PCR])

- pN0 (mol+): Metástase linfonodal detectada apenas por estudo molecular (RT-PCR), e não por histologia ou imunohistoquímica
- . pN1mi: Micrometástases (maior que 0.2 mm, mais de 200 células e ≤ 2,0 mm)
- . pN1a: Metástases em 1 a 3 linfonodos axilares, com ao menos uma metástase maior que 2,0 mm
- . pN2a: Metástases em 4 a 9 linfonodos axilares (ao menos uma metástase maior que 2,0 mm)
- . pN3a: Metástases em 10 ou mais linfonodos axilares (ao menos uma metástase maior que 2,0 mm)

(Is): utilizar se apenas o linfonodo sentinela foi avaliado. Se 6 ou mais linfonodos (sentinela ou não sentinela) são removidos, não utilizar esse modificador

*Consultar manual da AJCC para categorias linfonodais adicionais caso sejam incluídos linfonodos das cadeias mamária interna, infraclaviculares (nível III axilar) ou supraclavicular*

Metastases à distância (pM) (utilizar apenas cm espécime disponível para avaliação)

- . Não aplicável
- . pM1: Metástase à distância maior que 0,2 mm detectável histologicamente

Estadio	pTNM
0	pTis pN0 pM0
IA	pT1 pN0 pM0
IB	pT0 pN1mi pM0      pT1 pN1mi pM0
IIA	pT0 pN1 pM0      pT1 pN1 pM0      pT2 pN0 pM0
IIB	pT2 pN1 pM0      pT3 pN0 pM0
IIIA	pT0 pN2 pM0      pT1 pN2 pM0      pT2 pN2 pM0      pT3 pN1 pM0 pT3 pN2 pM0
IIIB	pT4 pN0 pM0      pT4 pN1 pM0      pT4 pN2 pM0
IIIC	pTx pN3 pM0
IV	pTx pNx pM1

## Anexo 2 - Quantificação do RNA extraído dos tecidos congelados

### Amostras de tecido tumoral

Identificação	Amostra	ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
1	M 42T	76,95	1,91	2,23
2	M 414T	278,00	2,09	1,97
3	M 424T	58,00	2,14	1,39
4	MIC 159T	102,08	1,93	2,40
5	MJ02028T	59,04	2,00	2,36
6	15751	71,28	1,91	2,34
7	17385	106,38	1,93	2,34
8	15792	79,98	1,86	2,24
9	17248	102,69	1,93	2,31
10	15763	82,18	1,91	2,26
11	M 535T-A	68,86	2,20	1,20
12	M 536T	163,54	2,10	1,50
13	M 433 T	328,45	2	1,8
14	M 435 T	118,8	2,1	1,7
15	M 570T	139,82	2,08	1,36
16	M 571T-B-2	364,95	2,02	1,48
17	M 572T	57,90	2,06	1,02
18	M 573T	85,22	2,02	1,04
19	M 574T	58,26	2,00	0,89
20	M 575T	218,71	1,93	1,22
21	M 576T	109,27	2,05	1,11
22	M 577T	38,61	1,98	0,86
23	M 578T	24,10	1,95	0,58
24	M 579T-B	16,53	2,08	0,45
25	M 580T	35,78	1,94	0,74
26	M 581T	269,76	2,04	1,58
27	M 582T	37,93	1,97	0,76
28	M 583T	73,48	2,06	1,06
29	M 585T	237,29	1,96	1,32

### Amostras de tecido mamário normal

Tubo ID	ID RNA	Conc ng/ $\mu$ l	R 260/280	R 260/230
<b>1B</b>	<b>M 284N-2</b>	141,83	1,90	1,11
<b>3B</b>	<b>M 191N-3</b>	71,59	2,00	1,13
<b>4B</b>	<b>M 459N</b>	153,58	1,84	1,00
<b>7B</b>	<b>M 376N-2</b>	107	2,06	1,23

## Anexo 3 - Parecer consubstanciado do CEP



FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE-HOSPITAL DO  
CÂNCER A C CAMARGO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Expressão de genes reguladores da diferenciação celular em carcinomas ductais invasivos da mama

**Pesquisador:** Fernando Augusto Soares

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 22509213.6.0000.5432

**Instituição Proponente:** Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 457.499

**Data da Relatoria:** 05/11/2013

**Apresentação do Projeto:**

Adequada.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar a expressão de membros da família HOX e relacionar sua expressão a fatores clínico-patológicos, tais quais idade, status menopausal, classificação histológica de Nottingham e acometimento de linfonodos e com dados de sobrevida, tanto global quanto livre de doença.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo relevante. Material e métodos adequados. Não há comprometimentos éticos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: osp\_hcancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo  
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE-HOSPITAL DO  
CÂNCER A C CAMARGO



Continuação do Parecer: 457.499

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica. Projeto sem pendências e/ou solicitações de esclarecimentos ao pesquisador.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Análise da Comissão de Pesquisa (COPE): Aprovado.

SAO PAULO, 14 de Novembro de 2013

  
Assinador por:  
Luiz Paulo Kowalski  
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

UF: SP

Telefone: (11)2189-5020

Município: SAO PAULO

Fax: (11)2189-5020

CEP: 01.509-900

E-mail: cep\_hcancer@accamargo.org.br

## Apêndice 1 - Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

### TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Referente à análise do projeto de pesquisa intitulado: Expressão de genes reguladores da diferenciação celular em carcinomas ductais invasivos da mama**

Eu, Fernando Augusto Soares, CRM/SP 40.110, Pesquisador Responsável pelo presente Projeto de Pesquisa a ser conduzido na Fundação Antonio Prudente - AC Camargo Cancer Center localizado Rua Professor Antonio Prudente, 211 – Departamento de Anatomia Patológica – São Paulo – SP, 01509-900, por este termo, solicito ao Comitê de Ética desta instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo, por se tratar de levantamento de dados junto à prontuários e/ou banco de materiais biológicos. Comprometo-me:

- a preservar a privacidade dos sujeitos de pesquisa cujos dados serão coletados;
- que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Esperando ter atendido satisfatoriamente às exigências desse Comitê, aguardamos retorno.

Atenciosamente,

Fernando Augusto Soares  
**Pesquisador Responsável pelo Projeto**  
Data: 29 / 08 / 2013

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900  
(11) 2189-5000 • [www.accamargo.org.br](http://www.accamargo.org.br)

Diretrizes para Projetos Retrospectivos 2013 - Versão 2 (Resolução CNS/MS nº 466/12)