

**ANÁLISE DE FATORES DO CONTROLE
TRADUCIONAL NO CARCINOMA INVASIVO DA
MAMA E ESTRUTURAÇÃO DE METODOLOGIA DE
TRANSLATÔMICA PARA AMOSTRAS TUMORAIS
HUMANAS**

HERMANO MARTINS BELLATO

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Gláucia Noeli Maroso Hajj

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ballato, Hermano Martins

Análise de fatores do controle traducional no carcinoma invasivo da mama e estruturação de metodologia de translaticônica para amostras tumorais humanas /

Hermano Martins Bellato - São Paulo, 2019.

143p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Glucia Noeli Maroso Hajj

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/diagnóstico/genética/patologia/Breast Neoplasms/
diagnosis/genetics/pathology. 2. RNA Mensageiro/RNA, Messenger. 3. Modificação
Traducional de Proteínas/Protein Modification, Translational. 4. Biomarcadores Tumorais/
Biomarkers, Tumor. 5. Proliferação Celular/genética/Cell Proliferation/genetics.



om namah śivāya gurave
satccidānanda mūrtaye
nisprapañcāya śantāya
nirāmbāya tejase

asato mā sad gamaya,
tamaso mā jyotir gamaya,
mṛtyor mā amṛtam gamaya,
om shanti shanti shanti

Hare Kṛṣṇa Hare Kṛṣṇa
Kṛṣṇa Kṛṣṇa Hare Hare
Hare Rāma Hare Rāma
Rāma Rāma Hare Hare



DEDICATÓRIA

Sempre acreditei que a existência de um trabalho só pode ser fruto da combinação entre o executor e uma fonte de inspiração...

Por isso, dedico esta tese a todos que fazem parte de mim e da minha história, pois todos contribuíram, de alguma forma, para que conseguisse finalizar mais um ciclo nesta existência...

Também, este trabalho é dedicado às pacientes que, voluntariamente, se doaram a ciência em prol das demais... Sem vocês este fragmento na construção do saber não teria sido possível...

AGRADECIMENTOS

À minha família nesta vida... Aos meus pais que tanto mudaram e passaram por este doloroso processo, gratidão por terem se permitido e se revolucionarem! Aos Cactos Originalis, Priscila Malaguti e Thais De Gennaro, que fizeram com que eu nunca mais soubesse o que era solidão pela certeza de vocês em meu caminho... A uma das maiores dádivas do yoga, Sheila Camargo, por me compreender melhor que eu mesmo...

Vô Zé Marquinho (in memoriam)... Obrigado pela presença em minha vida, por em todos os momentos me reconhecer pelo meu maior orgulho particular, por ser o melhor parceiro de truço e pelas visitas em meus sonhos!

Aos meus orientadores ao longo desta jornada. Dra. Glaucia Hajj, obrigado pela confiança, por compartilhar tão vasto conhecimento, por respeitar minhas ideias e por me tornar um cientista melhor. Dr. Ola Larrson, I will always be grateful for your guidance, confidence, to provide me the best time, for my welcome pint of Guinness and for the kind words during our last meeting in Stockholm.

Muito obrigado ao grupo de Biologia Tumoral e Biomarcadores. Aos pesquisadores Dr. Martín Roffé, Dr. Tiago Goss, Dra. Michele Landemberger e Dra. Vilma Martins. Aos alunos veteranos, por terem me recebido tão bem e me ensinado tanto, Eduardo Machado e Giovanna de Brito, e aos alunos novos, desejo toda a sorte do mundo a vocês, Matheus Lima, Fernanda Ferreira, Bárbara de Bellis e Julia Avian.

Aos alunos e amigos Fernanda Lupinacci, Luana Soares, Vitória Bianchi (in memoriam), Jéssica Cardoso e Danielle Nascimento... Fê, sem palavras pelo crescimento pessoal, suporte e por toda dedicação em nossos momentos... Lu, obrigado pela doçura de sempre... Vi, a menina mais corajosa que tive a oportunidade de conhecer... Jé, obrigado pelo carinho e reconhecimento, fiquei muito feliz em poder passar um pouquinho do meu conhecimento para você... Dani,

primeiramente Fora Temer, em segundo lugar obrigado por compartilhar tantas conversas incríveis.

A special thanks to Dr. Ola's science group. Laia Masvidal, thank you very much for all the reception, patience, teaching and friendship (I hope you always keep doing yoga). Julie Lorent, you are an amazing friend and I do miss do talk with you during my afternoons. Shuo Liang (Steve), Vincent van Hoef and Christian Oertlin, thank you very much for all the scientific discussions and knowledge shared.

Ao departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center. Obrigado a todos os funcionários e técnicos pelo apoio crucial na confecção deste projeto. Um agradecimento em especial a Dra. Cynthia Osório e ao Dr. Victor Piana, com os quais pude aprender tanto e foram sempre tão solícitos e colaborar com nossos objetivos.

As amigas da patologia, Elen Alves, Gabriela Madureira e Mayara Botelho...Elen, obrigado por ser tão simples e transparente e me mostrar estes valores todos os dias... Gabi, feliz por sempre ter lembranças boas com você e que me fazem sorrir sozinho e grato por ter tornado as disciplinas mais prazerosas... May, gratidão por todos os abraços, todos os sorrisos e força que você me mostrou durante sua história aqui. Vocês sempre estão em minhas meditações.

Um agradecimento especial ao BioBanco da instituição. Sem a parceria, apoio, eficiência e comprometimento dos amigos Ana Paula Suenaga, Louise Mota e Hugo Campos, este projeto não teria se concretizado em tempo hábil.

Sempre serei grato pelos maiores presentes que o doutorado me apresentou. Eloisa Olivieri... Seremos sempre amigos desde o dia que te vi em nossa entrevista no primeiro dia do doutorado. Obrigado pelo carinho, amizade sincera, risadas, companheirismo e, principalmente, por ter amenizado a trajetória simplesmente por sua presença! Bianca Troncarelli... Conheço-te de outras vidas. Obrigado pelo LollaPalooza, por cantar Agridoce comigo, por sermos apaixonados por Of

Monsters and Men, por ter ido me recepcionar no aeroporto quando voltei ao Brasil e por você sempre despertar o melhor de mim.

I am honored and so pleased that I could meet, in this life, my JägaFamily. Maya Keller, thank you very much for all excitement and for making me go kayaking (I was so scared)... Andrea, I will always miss your morning hugs and your amazing food... Isabella Hübscher, I am grateful that we could stay a little bit longer at Jäga and that I could see you again in Wien last year... Helene Zacher, you will always be my awesome girl next door, I am amazed how we connected and thank you for one of the best moments in my life that we had at Gotland (“it is ok to be sad sometimes!”).

Agradeço ao A.C.Camargo Cancer Center pela infraestrutura ímpar no Brasil e por incentivar a pesquisa nacional e formação de novos mestres e doutores na área de oncologia. A todos os técnicos e funcionários, especialmente aos do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE), sem os quais este trabalho não teria sido possível. Ao Instituto Karolinska (Estocolmo – Suécia), pelo fantástico investimento em pesquisa e por proporcionar um ambiente, o qual desperta a vontade de criar de estudantes do globo inteiro.

My Weekend PhD Gang. Diana Pelizzari e Laura de Freitas, vocês serão sempre minha calça de moletom... não precisamos estar juntos o tempo todo, porém sou grato pela certeza que vocês sempre estarão por aqui!

A um líder e amigo... Tony, obrigado pelo apoio, risadas, ensinamentos e pela amizade! Um grande presente que a Teva me deu!

A uma nova família que o vôlei trouxe e que tornou o final desta caminhada mais leve e alegre. Fernando Bellato, um primo que tive o prazer de encontrar no meio do caminho. Felipe Moscardi, um grande amigo com o qual consigo conversar horas sem ver o tempo passar. Jeferson Gonçalves (Jess), um irmão que encontrei e me surpreendo a cada dia com todas as semelhanças!

A CAPES e ao CNPq, agências de fomento nacionais que foram de fundamental importância para construção e manutenção do CIPE, onde puder trabalhar e desenvolver esta tese.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante este projeto (bolsa Doutorado Direto no país Processo nº 2014/04513-5 e bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior Processo nº 2015/11245-0).

RESUMO

Bellato HM. **Análise de fatores do controle traducional no carcinoma invasivo da mama e estruturação de metodologia de translatômica para amostras tumorais humanas.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução. O câncer de mama possui uma complexidade singular, apresentando considerável heterogeneidade. Os tumores desta patologia são classificados em subgrupos moleculares para um melhor direcionamento na conduta terapêutica. Entretanto, mesmo entre pacientes de um mesmo grupo existe uma ampla gama de prognósticos diferentes, o que indica a necessidade de mais estudos que possam ampliar nosso conhecimento desta enfermidade. A compreensão de mecanismos moleculares associados aos tumores de mama passa pela identificação de perfis de expressão gênica, tradicionalmente analisados pelos níveis de mRNAs. No entanto, essa abordagem não permite identificar mRNAs alvo do descontrole traducional, o que pode alterar o perfil protéico. De fato, alterações em diversas vias de sinalização que controlam a maquinaria de tradução foram observadas em tumores mamários. Portanto, o estudo do controle traducional permite compreender melhor a biologia da doença e identificar padrões de expressão gênica baseados no mRNA diferencialmente traduzido, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados ao câncer de mama. **Objetivo.** Padronizar e aplicar a identificação de mRNAs diferencialmente traduzidos (translatômica) em tumores de mama e estudar o impacto da expressão diferencial de fatores da maquinaria de tradução nas características clínico patológicas do câncer de mama. **Métodos.** A separação dos mRNAs diferencialmente traduzidos foi realizada através de perfil polissomal desenvolvido neste projeto. Os mRNAs associados aos polissomos foram isolados e identificados através de sequenciamento com construção de biblioteca single cell (Smart-Seq2). A expressão de fatores de início de tradução foi identificada utilizando imuno-histoquímica. **Resultados.** Foi desenvolvido um gradiente não-linear de sacarose para o isolamento de polissomos, otimizado para a extração de mRNAs em volume reduzido, permitindo a aplicação

em pequenas amostras de tecido tumoral. O isolamento e identificação dos mRNAs associados a polissomos foi realizada em 306 amostras de tumores de mama. Também, reações de imuno-histoquímica foram feitas para determinar a expressão dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A em uma nova casuística de 278 amostras de todos os grupos moleculares distribuídas em 6 TMAs previamente construídos na instituição. No grupo luminal a expressão dos 3 fatores estava correlacionada, porém sem correlação significativa com proliferação celular. Nas amostras classificadas como triplo-negativas, eIF5A e eIF4E se correlacionam entre si e com a expressão de Ki67, no entanto, eIF4G perde sua correlação com os demais fatores. **Conclusões.** A padronização da tradução e sua aplicação em amostras humanas foi realizadas com sucesso. Os resultados da futura identificação dos mRNAs diferencialmente traduzidos poderão orientar a descoberta de proteínas com expressão diferencial, as quais podem ser importantes mediadoras de processos tumorais. Com relação a expressão de fatores de início de tradução, no grupo triplo-negativo, o aumento da expressão dos fatores eIF4E e eIF5A correlaciona-se com o aumento do marcador Ki-67, indicando um possível papel destas proteínas da tradução específica e diferencial de um grupo de mRNAs importantes para este grupo molecular.

Descritores: Neoplasias da Mama/diagnóstico/genética/patologia. 2. RNA Mensageiro. Modificação Traducional de Proteínas. Biomarcadores Tumorais. Proliferação Celular/genética.

SUMMARY

Bellato HM. [**Analysis of translational control factors in invasive breast carcinoma and development of a translomics methodology for human tumor samples**]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction. Breast cancer has a unique complexity, presenting great clinical heterogeneity. Tumors within this pathology are classified into molecular subgroups to better address therapeutic management. However, even among patients from the same molecular subgroup there is a wide range of different prognoses, which indicates the necessity of further studies to increase our knowledge on this disease. The comprehension of the molecular mechanisms associated with breast tumors involves the identification of gene expression profiles, traditionally determined by mRNA levels. This approach does not allow the identification of mRNAs targets of translation control, which has a huge impact on the protein profile. In fact, changes in several signaling pathways that control the translation machinery have been observed in mammary tumors. Therefore, the study of translational control allows a better understanding of breast cancer biology and identifies gene expression patterns based on differentially translated mRNA, contributing to clarify molecular mechanisms associated with this disease. **Goal.** To develop and search for differentially translated (translomic) mRNAs in breast tumors and to study the impact of differential expression of translation machinery factors on clinical pathological features. **Methods.** The isolation of differentially translated mRNAs was performed through the polysomal profiling developed in this project. mRNAs associated with polysomes were fractionated and identified by single cell library preparation (Smart-Seq2) and RNA-seq. The expression of translational start factors was evaluated using immunohistochemistry. **Results.** A nonlinear sucrose gradient was developed from scratch for the isolation of polysomes, optimized for mRNAs extraction in reduced volumes, allowing application of this methodology on small tissue samples. The fractionation and mRNAs associated with polysomes identification was performed on 306 breast cancer samples. Also,

immunohistochemistry reactions were performed on a new set of 278 breast samples from all molecular groups distributed in 6 previously constructed TMAs to determine the expression of eIF4E, eIF4G and eIF5A translation factors. In the luminal group the expression of the 3 factors was correlated, although without any significant correlation with cell proliferation. eIF5A and eIF4E correlated with each other and with Ki67 expression in triple-negative samples, however, eIF4G lost its correlation with the other factors on this group. **Conclusions.** The development of a methodology that allows studying translationalomics on human samples was successfully performed. The results of future identification of differentially translated mRNAs may guide the discovery of proteins with differential expression that might be important mediators of tumor processes. Regarding the expression of translational factors, on the triple-negative group, the increased expression of the eIF4E and eIF5A factors correlated with increased Ki-67 staining, indicating a possible role of these specific translational proteins on a group of mRNAs important to induce proliferation in the triple-negative breast cancer molecular group.

Key-words: Breast Neoplasms/diagnosis/genetics/pathology. RNA, Messenger. Protein Modification, Translational. Biomarkers, Tumor. Cell Proliferation/genetics

PREFÁCIO

O grande objetivo desta tese foi compreender melhor o controle da tradução em humanos, assim com o impacto deste evento celular no câncer e, mais especificamente, nos tumores da mama. Assim, este projeto começou com três objetivos principais que foram desenvolvidos de forma cronológica. O primeiro deles teve como foco identificar as melhores condições que permitissem isolar mRNA total e polissomal em amostras humanas congeladas, o que incluía adaptação do gradiente de sacarose para melhorar o rendimento e construção de bibliotecas para sequenciamento com pouco material genético (SmartSeq2). Assim, seria possível adquirir uma perspectiva inédita da biologia desta doença. Este objetivo já foi publicado (LIANG et al. 2017), no qual o aluno compartilha a primeira autoria do artigo e este capítulo encontra-se apresentado em forma de artigo científico nesta tese. No segundo objetivo, aplicamos a técnica em tumores humanos congelados, algo nunca antes descrito na literatura científica. Para esta etapa, que contou com pouco mais de 300 amostras, foi estabelecida uma colaboração de fundamental importância com o Dr. Ola Larsson, do Instituto Karolinska (Estocolmo – Suécia). Porém, pela ampliação do desenho experimental, pela alta complexidade nas análises de bioinformática e o grande volume de informações, somente é descrito ao longo do segundo capítulo da tese, o isolamento do RNA polissomal e construção de bibliotecas. As análises e futuras validações serão realizados em estudos subsequentes pelo grupo da Dra. Glaucia Hajj.

Por último, o terceiro tópico abordou o controle da tradução em tumores

mamários analisando a expressão de fatores reguladores específicos. Foi possível encontrar associações previamente descritas na literatura, assim como achados inéditos e sugestão de um modelo hipotético, o qual propõe o impacto da tradução específica na progressão do câncer de mama. Os resultados e discussões acerca dos resultados experimentais estão demonstrados no terceiro capítulo.

Finalmente, todas as referências bibliográficas completas encontram-se alinhadas para consulta do leitor ao final da tese. Juntamente, também são encontrados, como anexos, a devida aprovação deste projeto pelo Comitê de Ética da instituição (Anexo 1), todas as análises estatísticas não contempladas durante o terceiro capítulo (Apêndice 1), um capítulo de livro publicado e escrito com a participação do aluno (Anexo 2), uma revisão científica publicada fruto da interação e sinergia dos conhecimentos entre o aluno e orientadora deste projeto (Anexo 3)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência dos tumores mas incidentes no sexo feminino ao redor do globo, pelo projeto GLOBOCAN 2018	1
Figura 2	Classificação molecular praticada na rotina clínica no diagnóstico do câncer de mama invasivo com base na expressão dos biomarcadores RE, RP e HER-2.....	6
Figura 3	O início da tradução tem um alto nível de regulação que envolve diversos fatores essenciais.....	12
Figura 4	As principais cascatas de sinalização que regulam a formação do complexo eIF4F estão representadas pela via PI3K/mTOR e a via de MAPK quinases.....	19
Figura 5	Inibição de eIF4E na heterogeneidade do tumor. Um diagrama esquemático que ilustra uma versão simplificada da diversidade dentro de um tumor de mama hipotético heterogêneo	24
Figura 6	Perfil polissomal representativo do grupo de amostras selecionadas.	55
Figura 7	Gráfico ilustrando a correlação entre as concentrações obtidas de RNA citosólico e polissomal de uma mesma paciente.....	57
Figura 8	Dois perfis representativos advindos de amostras de RNA total e polissomal, ilustrando os picos principais dos componentes majoritários de rRNA amplamente utilizados na avaliação qualitativa em extrações de RNA: 18S e 28S.....	59

Figura 9	Relação qualitativa do RNA (RIN) com a fração de origem (total ou polissomal) e subtipo molecular e análise da relação qualitativa entre RNA total e polissomal de uma mesma amostra.....	61
Figura 10	Cromatogramas do cDNA obtido após reação de transcrição reversa seguida de PCR pré-amplificatória	65
Figura 11	Perfis representativos de preparações de bibliotecas finais, porém ainda sem a inserção dos indexes.....	67
Figura 12	Análise da taxa de tradução vs. índice mitótico.....	72
Figura 13	Curvas de sobrevida livre de progressão analisando o impacto da taxa de tradução.....	75
Figura 14	Curvas de sobrevida global analisando o impacto da taxa de tradução	77
Figura 15	Análise da relação entre índice mitótico e tradução por grupo molecular do câncer de mama.....	79
Figura 16	Análise da relação entre os biomarcadores RE, RP e p53 com a taxa de tradução	80
Figura 17	Análise da relação entre necrose com a taxa de tradução	82
Figura 18	Demonstração gráfica da determinação dos pontos de corte para distribuir as pacientes analisadas em grupos de baixa expressão e alta expressão (SLD).....	89
Figura 19	Demonstração gráfica da determinação dos pontos de corte para distribuir as pacientes analisadas em grupos de baixa expressão e alta expressão (SCE)	90

Figura 20	Painel ilustrativo, representando um spot de cada subtipo molecular e a marcação com eIF4E	95
Figura 21	Painel ilustrativo, representando um spot de cada subtipo molecular e a marcação com eIF4G	96
Figura 22	Painel ilustrativo, representando um spot de cada subtipo molecular e a marcação com eIF5A	97
Figura 23	Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) para os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A	119
Figura 24	Curvas de sobrevida câncer específica (SCE) para os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A	120

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Panorama dos principais fatores de tradução no câncer de mama	22
Tabela 1	Características demográficas.....	49
Tabela 2	Características clínico-patológicas.....	51
Tabela 3	Expressão dos principais biomarcadores para câncer de mama determinados por imuno-histoquímica de rotina.....	53
Tabela 4	Distribuição das amostras em Grau Histológico (GH) e positividade para p53 por imuno-histoquímica	54
Tabela 5	Sumário com as principais características e condições aplicadas nas reações de imunohistoquímica realizadas neste capítulo	87
Tabela 6	Distribuição das variáveis clínicas (histórico de câncer de mama ou de qualquer outro tumor na família, menopausa, estadiamento clínico, recorrência e óbito) nos 4 grupos moleculares utilizados na rotina clínica do câncer de mama.....	92
Tabela 7	Distribuição das variáveis histopatológicas (TNM, tipo histológico, grau histológico e nuclear, presença de necrose e/ou inflamação e invasão endotelial, linfática ou perineural) nos 4 grupos moleculares utilizados na rotina clínica do câncer de mama.....	93
Tabela 8	Distribuição das principais variáveis quantitativas entre os 4 grupos moleculares utilizados na rotina clínica do câncer de mama	99
Tabela 9	Correlação entre a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A com os principais biomarcadores no câncer de mama	101

Tabela 10	Correlação entre a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A com os principais biomarcadores no câncer de mama (análise estatística calculada por meio do coeficiente ρ de Spearman) categorizados por subgrupo molecular.....	105
Tabela 11	Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a expressão do biomarcador para proliferação celular Ki67.....	106
Tabela 12	Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a determinação do índice mitótico	107
Tabela 13	Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a expressão do biomarcador para proliferação celular Ki67, agora categorizada por subgrupo molecular da doença.....	109
Tabela 14	Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a determinação do índice mitótico, agora categorizada por subgrupo molecular da doença.....	110
Tabela 15	Análise dos diferentes grupos da variável Grau Histológico (1, 2 ou 3) com a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A.....	113
Tabela 16	Análise dos diferentes grupos da variável Necrose Tumoral (ausente ou presente) com a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A	115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
3' UTR	<i>do inglês</i> , 3' <u>U</u> ntranslated <u>R</u> egion
40S	Subunidade menor do ribossomo eucariótico 43S PIC – <i>do inglês</i> , <u>P</u> re <u>I</u> nitiation <u>C</u> omplex 43S
48S	Complexo de início de tradução composto pelo 43S PIC + eIF4F- mRNA 4E-BPs – <i>do inglês</i> , eIF <u>4E</u> <u>B</u> inding <u>P</u> roteins
5' UTR	<i>do inglês</i> , 5' <u>U</u> ntranslated <u>R</u> egion
60S	Subunidade maior do ribossomo eucariótico 80S – Ribossomos eucariótico completo
A	Adenina
AJCC	<i>do inglês</i> , <u>A</u> merican <u>J</u> oint <u>C</u> ommittee on <u>C</u> ancer
AKT	<i>do inglês</i> , RAC- <u>α</u> <u>k</u> inase serine/threonine-protein
AUG	Códon de início da tradução
BCL-2	<i>do inglês</i> , B-cell lymphoma 2 <u>BRCA 1</u> – <i>do inglês</i> , <u>B</u> reast <u>C</u> ancer 1
BRCA 2	<i>do inglês</i> , <u>B</u> reast <u>C</u> ancer 2
BSA	Albumina do soro bovino
C	Citosina
CDI	<u>C</u> arcinoma <u>D</u> uctal <u>I</u> nvasivo
CDK 11	<i>do inglês</i> , Cyclin-dependent kinase 11
cDNA	<i>do inglês</i> , <u>c</u> omplementary DNA
CHX	Cicloheximida
CLI	<u>C</u> arcinoma <u>L</u> obular <u>I</u> nvasivo
cm	centímetros
CMF	<u>C</u> iclofosfamida, <u>M</u> etotrexato, 5- <u>F</u> luoruracil
CMI	<u>C</u> arcinoma <u>M</u> edular <u>I</u> nvasivo
DAB	3,3 – Diaminobenzidina
DMF	<u>D</u> emetilformamida
DNA	<i>do inglês</i> , <u>D</u> eoxyribonucleic acid
dNTP	<u>D</u> esoxirribonucleotídeos <u>T</u> rifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EBCTCG	<i>do inglês</i> , <u>E</u> arly <u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>T</u> rialists' <u>C</u> ollaborative <u>G</u> roup

eEF1A	<i>do inglês, eukaryotic Elongation Factor 1A</i>
eEF2	<i>do inglês, eukaryotic Elongation Factor 2</i>
EGF	<i>do inglês, Epidermal Growth Factor</i>
eIF1	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 1</i>
eIF1A	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 1A</i>
eIF2	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 2</i>
eIF3	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 3</i>
eIF4A	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 4A</i>
eIF4B	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 4B</i>
eIF4E	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 4E</i>
eIF4F	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 4F</i>
eIF4G	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 4G</i>
eIF4H	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 4H</i>
eIF5	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 5</i>
eIF5A	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 5A</i>
eIF6	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factor 6</i>
eIFs	<i>do inglês, eukaryotic Initiation Factors</i>
ErbB-2	<i>do inglês, Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2</i>
eRF1	<i>do inglês, eukaryotic Release Factor 1</i>
eRF3	<i>do inglês, eukaryotic Release Factor 3</i>
ERK	<i>do inglês, Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ESMO	<i>do inglês, European Society for Medical Oncology</i>
EtOH	Etanol
FISH	<i>do inglês, Fluorescence in situ hybridization</i>
G	Guanina
GCN2	<i>do inglês, General Control Nonderepressible 2</i>
GDP	<i>do inglês, Guanosine Diphosphate</i>
GTP	<i>do inglês, Guanosine Triphosphate</i>
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Coloração com Hematoxilina e Eosina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
HER2	<i>do inglês, Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HRI	<i>do inglês, Eukaryotic Translation Initiation Factor 2-Alpha Kinase 1</i>
IARC	<i>do inglês, International Agency for Research on Cancer</i>

IHQ	<u>I</u> mu <u>n</u> o- <u>h</u> isto <u>q</u> u <u>í</u> mica
IM	Índice mitótico
INCA	Instituto <u>N</u> acional do <u>C</u> âncer
IRES	<i>do inglês</i> , <u>I</u> nternal <u>R</u> ibosome <u>E</u> ntry <u>S</u> ite
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
Ki-67	<i>do inglês</i> , Antigen identified by monoclonal antibody <u>K</u> i-67
LA	<u>L</u> uminal <u>A</u>
LB	<u>L</u> uminal <u>B</u>
LNA	<i>do inglês</i> , <u>L</u> ocked <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
M	Molar
M-MLV	<i>do inglês</i> , Moloney murine leucemia
m⁷Cap	Capacete de 7-metil guanosina
MAPK	<i>do inglês</i> , <u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
MEK	<i>do inglês</i> , <u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
MgCl₂	Cloreto de magnésio
miRNA	microRNA
MKI67	<i>do inglês</i> , <u>M</u> arker of proliferation <u>K</u> i-67
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>do inglês</i> , <u>M</u> ammalian <u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin
mTORC1	<i>do inglês</i> , mTOR <u>C</u> omplex 1
MYC	<i>do inglês</i> , MYC proto-oncogene
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
Na₃C₆H₅O₇	Citrato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
NIH	<i>do inglês</i> , <u>N</u> ational <u>I</u> nstitute of <u>H</u> ealth
NST	<i>do inglês</i> , of <u>N</u> o <u>S</u> pecial <u>T</u> ype
oligo-dT	Nucleotídeos desoxi-timina
ORF	<i>do inglês</i> , <u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>G</u> <u>F</u> rame
p53	<i>do inglês</i> , <u>P</u> rotein 53
PABP	<i>do inglês</i> , <u>P</u> oly <u>A</u> <u>B</u> inding <u>P</u> roteins

pb	Pares de base
PBS	<i>do inglês</i> , phosphate-buffered saline
PCR	<i>do inglês</i> , Polymerization Chain Reaction
PDCD4	<i>do inglês</i> , Programmed Cell Death 4
PERK	<i>do inglês</i> , Eukaryotic Translation Initiation Factor 2-Alpha Kinase 3
pg	Picogramas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>do inglês</i> , Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKR	<i>do inglês</i> , Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase
poli(A)	Cauda poli A do mRNA
PTC	<i>do inglês</i> , Peptidyl Transferase Center
PTEN	<i>do inglês</i> , Phosphatase and Tensin homolog
RAF	<i>do inglês</i> , RAF proto-oncogene, GTPase
RAS	<i>do inglês</i> , RAS proto-oncogene, GTPase
RE	Receptor de Estrógeno
rG	Riboguanosina
RGH	Registro Geral do Hospital (número de identificação de cada paciente no A.C.Camargo Cancer Center)
RH	Receptores Hormonais
RIN	<i>do inglês</i> , RNA Integrity Number
RNA	<i>do inglês</i> , Ribonucleic Acid
RP	Receptor de Progesterona
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>do inglês</i> , Real Time Polimerization Chain Reaction
S6K1	<i>do inglês</i> , Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEER	<i>do inglês</i> , Surveillance, Epidemiology, and End Results
Sítio A	Sítio aminoacil do ribossomo
Sítio P	Sítio peptidil do ribossomo
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SCE	Sobrevida Câncer-Específica
T	Timina
TAPS	Ácido [tris(hydroxymethyl)methylamino]propanesulfônico
TC	<i>do inglês</i> , Ternary Complex
TCGA	<i>do inglês</i> , The Cancer Genome Atlas

TMA	<i>do inglês, T</i> issue <i>M</i> icro <i>a</i> rray
TN	<i>T</i> riplo <i>N</i> egativo
Tn5	Transposase hiperativa
TNM	Sistema TNM: T = <i>T</i> umor primário; N = <i>N</i> linfonodo; M = <i>M</i> etástase
TP53	<i>do inglês, T</i> umor <i>P</i> rotein 53
TR	Transcrição reversa
Tris	Trisaminometano ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)
Trizol	Mistura fenólica ácida (pH 4,5) com isotiocianato de guanidina
tRNA	RNA transportador
tRNA_i^{Met}	RNA transportador aminoacilado com uma metionina iniciadora
TSO	<i>do inglês, T</i> emplate <i>S</i> witching <i>O</i> ligo
U	Uracila
v/v	Relação volume/volume
VEGF	<i>do inglês, V</i> ascular <i>E</i> ndothelial <i>G</i> rowth <i>F</i> actor
WHO	<i>do inglês, W</i> orld <i>H</i> ealth <i>O</i> rganization
xg	Veze maior que a força gravitacional da Terra
µL	Microlitro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O Câncer de Mama	1
1.1.1	A Doença.....	2
1.1.2	Classificação da doença	3
1.1.3	Tratamento	9
1.2	Tradução de RNAs mensageiros.....	11
1.2.1	O processo de tradução na célula eucariótica	11
1.2.2	As principais vias de sinalização que controlam a maquinaria de tradução ...	17
1.2.3	Descontrole traducional e o impacto no câncer de mama.....	20
1.3	Translatômica: análise em larga escala por uma nova perspectiva.....	27
1.3.1	A translatômica	27
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo principal	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1	Padronização de metodologia que permita a aplicação da translatômica em amostras tumorais mamárias advindas de BioBanco	32
3.2	Aplicação da translatômica em amostras de câncer de mama invasivo originadas do BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center	46
3.2.1	Materiais e Métodos.....	47
3.2.1.1	Casuística	47
3.2.1.2	Perfil Polissomal (Preparação das amostras, lise e fracionamento do mRNA polissomal)	47
3.2.2	Resultados e discussão deste objetivo.....	47
3.2.2.1	Panorama demográfico, histopatológico e molecular das amostras	48
3.2.2.2	Perfil polissomal com as amostras obtidas do BioBanco do A.C. Camargo Cancer Center	54

3.2.2.3	Extração de RNA e construção de bibliotecas segundo a metodologia Smart seq2.....	56
3.2.2.4	Síntese de bibliotecas por meio da metodologia Smart-seq2.....	62
3.2.2.5	Análise das taxas de tradução determinadas por perfil polissomal com informações anatomopatológicas das pacientes desta casuística	69
3.3	Estudo do impacto da expressão dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G eIF5A no curso clínico dos tumores invasivos da mama.....	83
3.3.1	Materiais e Métodos.....	83
3.3.1.1	Casuística	83
3.3.1.2	Reação de imuno-histoquímica (As principais características desta metodologia estão resumidas na Tabela 10).	85
3.3.1.3	Quantificação das reações de imuno-histoquímica e determinação do HSCORE.....	87
3.3.1.4	Análise estatística.....	88
3.3.2	Resultados e discussão deste objetivo.....	91
3.3.2.1	Descrição da casuística utilizada neste capítulo e ilustração da morfologia tecidual marcada por imunohistoquímica identificando os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A	91
3.3.2.2	Análise da expressão proteica diferencial dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A nos subgrupos moleculares do carcinoma mamário	100
3.3.2.3	Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A na proliferação celular no câncer de mama	106
3.3.2.4	Análise da relação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A no grau de diferenciação celular e incidência de necrose no câncer de mama.....	112
3.3.2.5	Análise da sobrevida (livre de doença e câncer-específica) levando-se em consideração a baixa e alta expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A.....	116
4	CONCLUSÕES	123
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Capítulo intitulado “Comparative Effectiveness of HER2 in cancer: a pathology overview from diagnosis to treatment”

Anexo 3 Revisão de literatura científica acerca do fator de início de tradução eIF2 α e o impacto de seu descontrole em neurônios

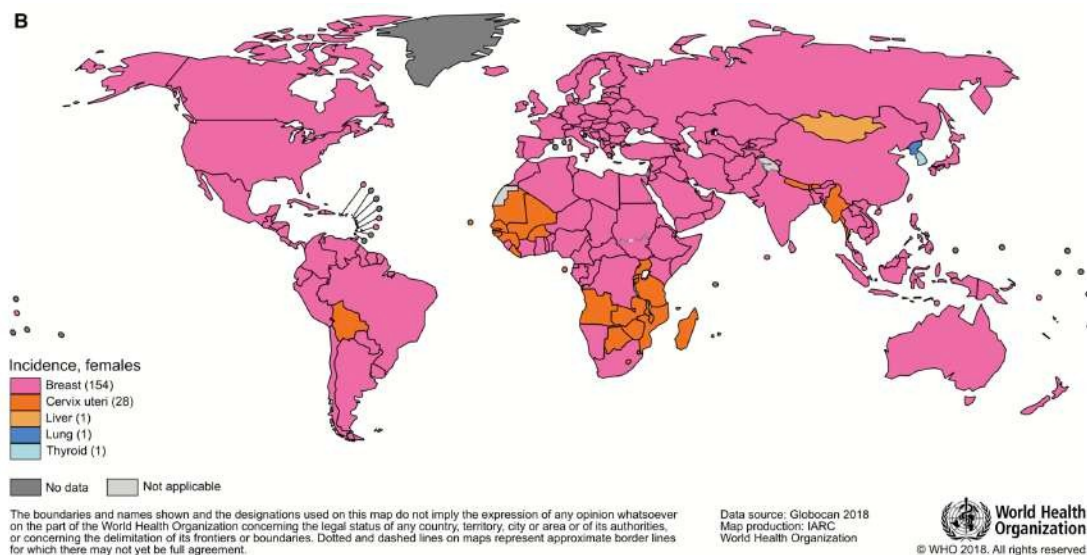
APÊNDICE

Apêndice 1 Este anexo contempla as demais análises estatísticas feitas e não mostradas no capítulo 3 da seção 3 desta tese. Aqui estão organizadas as análises das demais variáveis clínicas com a expressão dos fatores estudados: eIF4E, eIF4G e eIF5A

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

O Câncer de mama é mundialmente o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, sendo muito raro na população masculina (**Figura 1**). É considerado o segundo tipo de tumor mais frequente na população de forma geral e a quinta causa de morte por neoplasias (FERLAY et al. 2010; TAO et al. 2014; TAO et al. 2015). Para o Brasil, no biênio 2018-2019, são esperados 59.700 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, o que representa mais de 20% da incidência total de tumores na população feminina, de acordo com o INCA.



Fonte: BRAY et al. (2018).

Figura 1 - Incidência dos tumores mais incidentes no sexo feminino ao redor do globo, pelo projeto GLOBOCAN 2018. Destaque para o câncer de mama como o mais incidente nesta população ao redor do globo.

1.1.1 A Doença

O risco de desenvolvimento da doença aumenta segundo a idade, sendo um dos fatores mais importantes. Adicionalmente, a presença de obesidade e o consumo crônico de álcool também são considerados fatores de risco importantes para incidência desta patologia (MCPHERSON et al. 2000). A incidência pode dobrar a cada 10 anos no período pré-menopausa e mulheres entre 80 a 85 anos apresentam uma probabilidade 15 vezes superior ao surgimento da doença, quando comparadas com mulheres de 30 a 35 anos (VOGEL 2008). O histórico hormonal, como menarca precoce (antes dos 12 anos de idade), menopausa tardia (após os 55 anos) e o histórico reprodutivo da mulher (nuliparidade ou idade tardia da primeira gestação) também representam fatores de risco importantes para o surgimento do câncer de mama. Estes efeitos podem ser consequência do maior tempo de exposição aos hormônios femininos endógenos, estrógeno e progesterona, os quais são ativadores da proliferação de células do tecido mamário (AKRAM et al. 2017).

A realidade da doença também é agravada pelo fato de aproximadamente 7% das mulheres já apresentarem metástase no momento do diagnóstico, mesmo com o aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas. Esse quadro clínico é tipicamente incurável e os esquemas terapêuticos são aplicados com fins paliativos, com sobrevida média de 9 meses a 3 anos (CHANG et al. 2003; MARINHO et al. 2008). Dentre as mulheres que são diagnosticadas em estádios iniciais da doença, a chance do surgimento de metástase pode chegar a 70% em até 5 anos, dependendo da condução do tratamento e características do tumor, como presença de processo inflamatório e perfil genético associado (JUNG et al. 2012; HAM e MOON 2013).

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e

sobrevida são extremamente variáveis. Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral (índice mitótico, relacionado com a agressividade tumoral), estadiamento do tumor, potencial de metastatização, perfil genético da paciente, presença de mutações em genes específicos como *BRCA1* e *BRCA2*, expressão de determinados marcadores como o gene *MKI67*, que expressa a proteína Ki-67 relacionada com proliferação celular, presença de inflamação, condição imunológica, hormonal e nutricional e outros mecanismos, os quais ainda não são completamente compreendidos. Apesar de certos aspectos anatômicos, como tamanho do tumor primário e o acometimento dos linfonodos, continuarem a serem fatores importantes na avaliação prognóstica, uma série de características histológicas e biológicas como grau nuclear, grau histológico e dosagem de receptores hormonais são determinantes para o prognóstico da doença (STAFIN et al. 2012).

1.1.2 Classificação da doença

O câncer de mama não é considerado uma doença única, apresentando alta heterogeneidade em níveis patológicos, moleculares e clínicos, o que reflete uma progressão diferente em cada paciente (WEIGELT e REIS-FILHO. 2009; MUGGERUD et al. 2010; STAFIN et al. 2012). Esta diversidade fenotípica resulta nas diferenças observadas em relação ao crescimento tumoral, capacidade de invasão e potencial metastático. São consideradas características demográficas da paciente (como idade, menopausa, nuliparidade, histórico oncológico na família, etc) características do tumor (tamanho da massa tumoral, comprometimento linfonodal, tipo histológico determinado pela anatomia patológica) e marcadores biológicos de

rotina clínica conforme descrito abaixo (ANDERSON et al. 2014):

- A) Expressão dos receptores hormonais (estrógeno [RE – receptor de estrógeno] + progesterona [RP – receptor de progesterona] = receptores hormonais [RH]);
- B) Amplificação do número de cópias do gene *HER2* (*do inglês* – Human Epidermal growth factor Receptor 2 ou ErbB2) por meio da expressão aumentada da proteína HER-2 por determinação Imuno-histoquímica (IHQ) ou técnicas de hibridização *in situ* (Ex.: *do inglês* FISH – Fluorescent *In Situ* Hybridization);
- C) Expressão do gene *MKI67* (*do inglês* – Marker of proliferation 67), cuja proteína Ki-67 está relacionada com proliferação celular;
- D) Presença de alguma mutação no gene *TP53* (*do inglês* – Tumor Protein 53), por meio do acúmulo citoplasmático da proteína p53 em reações de imuno-histoquímica (atualmente o biomarcador p53 não é utilizado de forma rotineira, pois o mesmo não é considerado como fator na tomada de decisão da conduta terapêutica. Entretanto, a funcionalidade correta da proteína é classicamente descrita como fator protetor ao câncer).

O sistema de estadiamento utilizado para esta patologia é o sistema TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), atualmente na 8ª edição para o câncer de mama, com última atualização em 22/11/2017 (HORTOBAGYI et al. (2017).

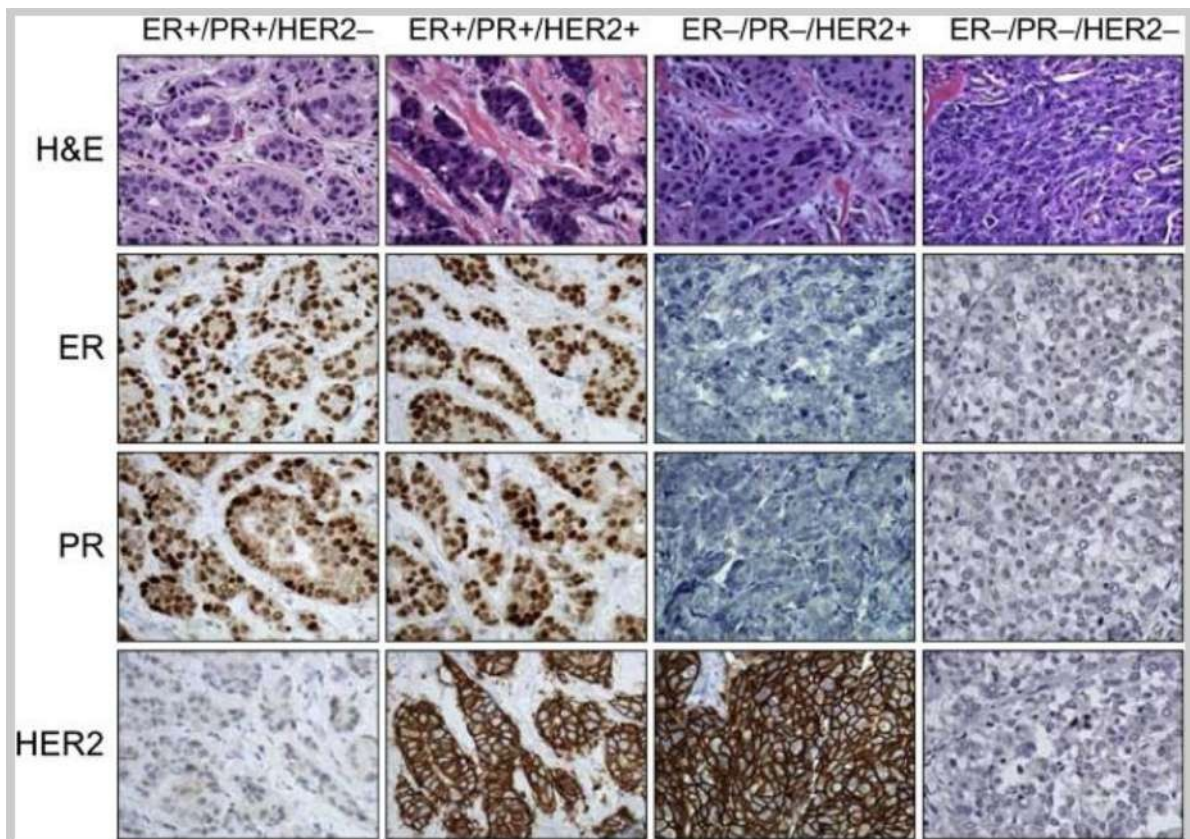
O tamanho do tumor (T) apresenta correlação estatística com a sobrevida global e risco de recorrência (HORTOBAGYI et al. 2017). Pacientes com tumores <1,0 cm têm uma sobrevida geral próxima de 99% comparado com 89% para tumores entre 1,0 a 3,0 cm, e 86% para tumores entre 3 a 5 cm (CARTER et al.

1989). Já em pacientes com tumores menores do que 1,0 cm, aproximadamente 90% das pacientes não apresentam linfonodos comprometidos e têm uma sobrevida livre da doença mediana em torno de 10 anos (FITZGIBBONS et al. 2000; NAROD 2012).

O parâmetro N diz respeito ao status dos linfonodos axilares e é feito por ressecção cirúrgica e posterior análise anatomopatológica, o que permite estabelecer o comprometimento metastático nestes órgãos (HORTOBAGYI et al. 2017). Existe uma associação entre a quantidade de linfonodos positivos e o aumento da mortalidade em pacientes com câncer de mama (SCHIFFMAN et al. 2011). Já a metástase à distância é descrita pelo parâmetro M, informando se houve ou não migração por via sanguínea ou linfática de células cancerosas provenientes do tumor primário para órgãos distantes e não contíguos à mama (HORTOBAGYI et al. 2017). A heterogeneidade fenotípica percebida no câncer de mama é observada histopatologicamente, pela classificação da doença em grupos significativos que podem apresentar caráter não invasivo e invasivo (carcinoma “*in situ*” e carcinoma infiltrante ou invasivo, respectivamente) (ABREU et al. 2002). Atualmente, a WHO reconhece a existência de pelo menos 17 tipos histológicos distintos de câncer de mama invasivo (WEIGELT e REIS-FILHO. 2009). Padrões estruturais e morfológicos são utilizados para a classificação histológica. Dentre os mais frequentes apresentam-se: carcinoma ductal invasivo (CDI ou *do inglês* NST – No Special Type) (50-80%), carcinoma lobular invasivo (CLI) (5-15%) e carcinoma medular invasivo (CMI) (1-7%) (Böcker 2003).

Além da classificação histológica, são muito utilizadas as estratificações com base no perfil de expressão de genes determinados. Os primeiros sistemas de

classificação genética dos tumores de mama foram criados há mais de uma década e distinguem a doença, na prática clínica, em quatro grandes grupos com diferentes prognósticos e estratégias terapêuticas (FOCKE et al. 2016; MORIGI 2017; CURIGLIANO et al. 2017; GNANT et al. 2017) (**Figura 2**).



Fonte: RIVENBARK et al. (2013).

Figura 2 - Classificação molecular praticada na rotina clínica no diagnóstico do câncer de mama invasivo com base na expressão dos biomarcadores RE, RP e HER-2. São apresentados exemplos, nos quais a histologia é representada usando coloração com hematoxilina e eosina (HE). A expressão de RE, PR e HER-2 é identificada utilizando a técnica de imuno-histoquímica. Os tumores de mama são geralmente classificados como positivos ou negativos para os biomarcadores em questão, resultando em quatro agrupamentos clínicos principais: ER+/PR+/HER-2- (Luminal A), ER+/PR+HER-2+ (Luminal B), ER-/PR-/HER-2+ (HER2) e ER-/PR-/HER-2- (Triplo Negativo)

O primeiro grupo molecular é denominado Luminal A (LA), sendo positivo (em, pelo menos, 1% das células marcadas por imuno-histoquímica (IHQ)) para o Receptor de Estrógeno (RE) e positivo (em pelo menos 20% das células marcadas por IHQ) para o Receptor de Progesterona (RP) (estes dois marcadores podem ser agrupados em um só e chamado de Receptores Hormonais (RH)) e negativo para a superexpressão do gene *HER2* (ANDERSON et al. 2014). Interessantemente, pacientes classificadas como Luminal A apresentam expressão para RP maior que 20%, o que indica menor comprometimento da via ativada pelo estrógeno e também maior grau de diferenciação celular (MOHAMMED et al. 2015; REN et al. 2016). Considerando a biologia tumoral, é descrito que tumores mais diferenciados apresentam processos celulares mais comprometidos em funções determinadas e, conseqüentemente, apresentam menores índices proliferativos (PRAT e PEROU 2009; ALBERTS et al. 2010). Este fato é refletido na expressão de Ki-67 ser menor que 20% nestas pacientes, o que corresponde a um menor índice mitótico e, assim, um melhor prognóstico esperado.

A principal forma de tratamento nesse tipo de câncer de mama é a chamada terapia endócrina, constituída de fármacos que interferem diretamente nos receptores hormonais ou na síntese dos ligantes. Dentre os fármacos de primeira escolha tem-se o Tamoxifeno, cujo mecanismo de ação ainda não é considerado claro, porém acredita-se que o seu maior papel antiproliferativo nas células neoplásicas advinha da sua função antagonista no RE (HAMMOND et al. 2010). Os Inibidores de Aromatase também correspondem a uma classe de medicamentos amplamente utilizada contra tumores de mama classificados no grupo Luminal A. A enzima aromatase também é conhecida como estrógeno-sintetase e é responsável pela síntese

de estrogênio nas gônadas, adipócitos e córtex suprarrenal e, muito interessadamente, no próprio tumor (OLIN e STPIERRE 2014). Portanto o grupo Luminal A, por suas características, possui um crescimento mais lento, é menos agressivo, com menores taxas de recidiva e maior sobrevida livre de doença, destacando que este é o grupo com maior incidência, com valores em torno de 40% (ANDERSON et al. 2014).

Já os tumores do tipo Luminal B (LB) são RE positivos, entretanto apresentam expressão para RP menor que 20%, ou expressão de Ki-67 superior a 20% ou aumento no número de cópias do gene *HER2*. Desta forma, apresentam um índice proliferativo maior, pior prognóstico em comparação ao grupo Luminal A e menor sobrevida livre de doença, correspondendo a cerca de 20-30% dos tumores de mama. Os tumores do grupo Luminal B também respondem bem a terapia endócrina e são tratados, como os Luminais A, por 5 anos após a cirurgia (ANDERSON et al. 2014).

O terceiro grupo é caracterizado pela superexpressão do gene *HER2* por um aumento no número de cópias neste gene. Estes tumores mamários apresentam um índice mitótico elevado e um pior prognóstico. A distribuição dos biomarcadores de rotina clínica são: negatividade para a expressão dos receptores hormonais e, de uma maneira geral, apresentam expressão de Ki-67 superiores a 20% ou aumento da expressão proteica de *HER2* determinada por IHQ e, também, determinada pelo aumento no número de cópias do gene confirmada por FISH, quando necessário. Este grupo apresenta uma incidência em torno dos 10-20% Também existem terapias dirigidas para este grupo, como anticorpos monoclonais (Ex.: trastuzumabe e pertuzumabe) contra o produto do gene *HER2*, quando este é expresso. (SLAMON et al. 2001; ANDERSON et al. 2014).

O último grupo é conhecido como Basal-like e compreende uma considerável quantidade de tipos tumorais que não se enquadram nos outros 3 grupos anteriores. Dentre eles, o subgrupo mais conhecido é o câncer de mama chamado de “triplo-negativo” (TN), ou seja, RE negativo, RP negativo e *HER2* negativo. O grupo é enriquecido para tumores Triplo-Negativos devido a classificação majoritariamente feita por imunohistoquímica, uma vez que a classificação exata como basal-like deve ser feita de forma gênica. Geralmente é diagnosticado em pacientes mais jovens, apresentando um alto grau histológico, células com assinatura genética mais desdiferenciada, altas taxas de recidiva e metástase após cirurgia, prognóstico ruim e inexistência de terapia dirigida, sendo empregada a quimioterapia convencional à base de antraciclinas e taxanos (PRAT e PEROU 2009; PAL et al. 2011; ANDERSON et al. 2014; BOWER et al. 2017).

A atual classificação nos grupos moleculares descritos acima é de essencial importância. Contudo, essa categorização não é precisa e também não permite a ideal individualização terapêutica, uma vez que dentro de um mesmo subtipo molecular existem prognósticos desiguais e respostas terapêuticas distintas frente a uma mesma abordagem clínica. Este cenário reflete não somente a heterogeneidade tumoral no câncer de mama, como também ressalta a grande importância da identificação de novos marcadores e modelos de classificações moleculares mais acurados (SCHNITT 2010; HIRATA et al. 2014).

1.1.3 Tratamento

O tratamento inclui cirurgia, preferencialmente com a maior conservação do órgão (SENKUS et al. 2015 [ESMO *Guidelines*]), seguida de radioterapia. A terapia

com radiação total da mama por si só reduz o risco de qualquer recidiva em 10 anos em 15% e o risco de mortalidade em 15 anos relacionada ao câncer de mama em 4% (DARBY et al. 2011). A decisão sobre o tratamento adjuvante sistêmico deve basear-se na sensibilidade prevista a determinados tipos de tratamento, ao benefício do uso e ao risco de recaída do paciente. A decisão final também deve incorporar também o perfil de segurança do tratamento, a idade do paciente, status geral de saúde e comorbidades (LOHRISCH et al. 2006).

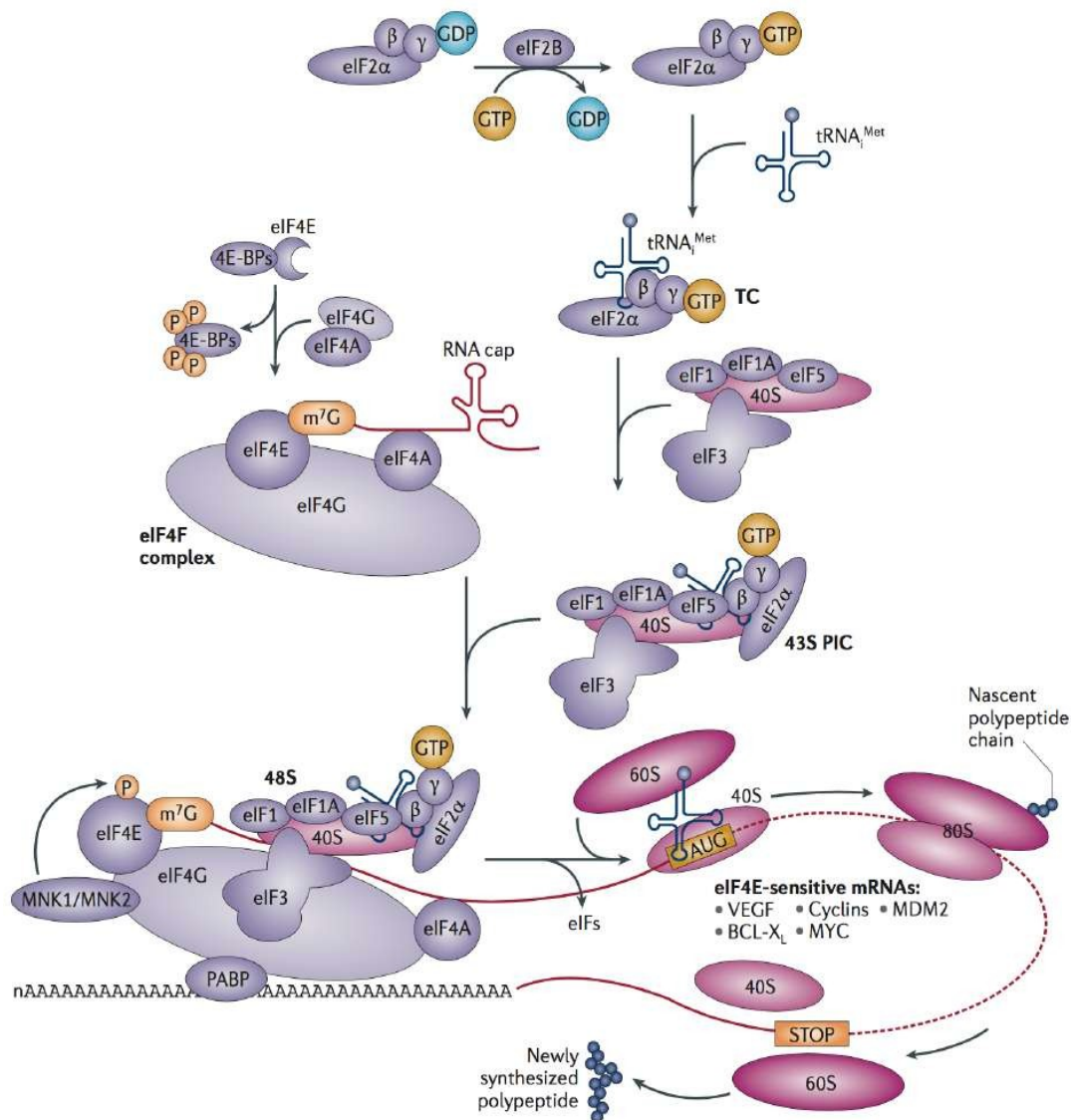
A terapia endócrina é indicada para todas as pacientes com expressão para RE com, no mínimo, 1% de expressão identificado por imuno-histoquímica, independentemente do uso concomitante de quimioterapia convencional ou alguma outra terapia-alvo (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG) 2005).

Nas pacientes classificados como triplo-negativo e *HER2* e, também, nos tumores luminais *HER2* negativos de alto risco, a quimioterapia é recomendada com nível de evidência IA. É descrito um maior benefício clínico da quimioterapia nos tumores RE negativos. Este fato é correlacionado com o fato da quimioterapia citotóxica ser inespecífica e eliminar células com índices proliferativos mais altos, o que é mais característico dos tumores de mama triplo-negativos e daqueles que apresentam superexpressão de *HER2*, conforme mencionado acima (BERRY et al. 2006; CLARKE et al. 2008). Os regimes mais utilizados incluem antraciclina ou taxanos, principalmente em dose densa, embora, raramente, em alguns pacientes o esquema denominado CMF (Ciclofosfamida, Metotrexato e 5-Fluoruracil) possa ser usado (SENKUS et al. 2015).

1.2 TRADUÇÃO DE RNAs MENSAGEIROS

1.2.1 O processo de tradução na célula eucariótica

O processo de tradução de um RNA mensageiro (mRNA) é altamente conservado e pode ser dividido em 4 etapas principais: início, alongação, término e a reciclagem dos ribossomos (ALBERTS et al. 2010). O início da tradução de mRNAs canônicos é a etapa mais regulada e considerada limitante na síntese proteica, com o envolvimento de diversos fatores associados. Em eucariotos, os fatores de início de tradução (“eukaryotic initiation factors” – eIFs) regulam o recrutamento e montagem de um ribossomo maduro e competente em uma fita de mRNA, concomitantemente com o escaneamento desta fita para a identificação da sequência aberta de leitura (*do inglês* ORF – Open Reading Frame), conforme ilustrado na **Figura 3** (HINNEBUSCH e LORSCH 2012).



Fonte: BAHT et al. (2015).

Figura 3 - O início da tradução tem um alto nível de regulação que envolve diversos fatores essenciais. O escaneamento do mRNA na busca do AUG (códon de início) depende da ligação entre o complexo ternário (eIF2α, β e γ – tRNA_i – GTP) e a subunidade ribossomal pequena 40S, com a assistência de fatores importantes como eIF3 e eIF5, assim resultando no complexo de pré-iniciação 43S. Concomitantemente, o mRNA maduro é estabilizado pelo complexo eIF4F (eIF4A, eIF4B e eIF4G) se ligando no m⁷Cap e a PABP se ligando na cauda Poli(A). O ancoramento de eIF4F e PABP é fundamental para a correta ligação entre o 43S e a fita de mRNA. A formação do complexo de pré-iniciação 48S permite ao varrimento do mRNA para identificação do primeiro AUG e também colocar o tRNA_iMet no sítio P (peptidil) do ribossomo. eIF5 induz a hidrólise de uma molécula de GTP, liberando alguns fatores de iniciação, tais como eIF3 e a ligação de GTP a eIF5B, o que permite que este último fator recrute a subunidade ribossomal 60S, formando o complexo de iniciação 80S completamente pronto para começar o primeiro ciclo de elongação.

A grande variabilidade nas taxas de tradução pode ocorrer por diversos mecanismos associados ao início deste processo, como presença de estruturas secundárias na região não traduzida 5' (*do inglês* 5'UTR – 5' UnUnUnsUlated Region), regulação dos fatores de início (eIFs) por vias de sinalização (ex.: o eixo PI3K/AKT/mTOR e a via de MAPK quinases) e interferência por micro RNAs (miRNAs) (GAO e ROUX 2015).

O fator eIF4F é constituído por 3 subunidades: eIF4E (ligante do capacete de 7- metil guanosina -m⁷Cap- presente no mRNA), eIF4A (fator com atividade de helicase, atuando na remoção de estruturas secundárias na região 5'UTR) e eIF4G (atua como um esqueleto molecular, tendo domínio de ligação química com as demais estruturas) (GINGRAS et al. 1999). As principais funções deste fator, portanto, são selecionar RNAs que contenham m⁷Cap, recrutar a subunidade ribossomal menor (40S) e remover obstáculos físicos, permitindo o escaneamento da fita do mRNA no objetivo de encontrar o códon de início da tradução (AUG). Além disso, particularmente eIF4G possui um papel importante, interagindo fisicamente com PABP (*do inglês* – Poly A Binding Proteins). Estas proteínas ligam-se à cauda poli(A) e, ao interagir com eIF4G, circularizam o mRNA em uma estrutura única em células eucarióticas durante a tradução. Acredita-se ser interessante, do ponto de vista celular, que a tradução ocorra somente nesta conformação, pois, assim, somente mRNA íntegros são traduzidos e, ao mesmo tempo, são protegidos de possíveis degradações (GEBAUER e HENTZE 2004).

Interessantemente é possível perceber que alguns fatores atuam na tradução de forma global, como eIF4E, o qual se liga no m⁷Cap de qualquer mRNA. Entretanto, outros fatores podem atuar favorecendo a tradução seletiva de um grupo

particular de mRNAs. eIF4A tem sua função como helicase estimulada por outros dois fatores acessórios: eIF4B e eIF4H. O primeiro é amplamente descrito na literatura e atua na maioria dos mRNAs já identificados com estruturas secundárias na 5'UTR (OZES et al. 2011; FEOKTISTOVA et al. 2013). Já o segundo, foi descrito mais recentemente, e não favorece a tradução dos mesmos transcritos já identificados com a atividade de eIF4B, sugerindo que eIF4H possa atuar seletivamente em estruturas secundárias específicas e uma população particular de mRNAs (PARSYAN et al. 2011).

Concomitante a circularização do mRNA e ligação do complexo eIF4F, ocorre a formação do Complexo de Pré-Iniciação 43S (*do inglês* 43S PIC – Pre Initiation Complex 43S). Inicialmente os fatores eIF1 e eIF1A se ligam a um 40S (subunidade ribossomal menor) livre. Estes fatores são importantes para estabilizar a ligação sequencial com o mRNA. Também, ligam-se ao 40S os fatores eIF5 e eIF3. Este último, atua como arcabouço molecular na ligação entre o mRNA-eIF4F e o 43S PIC (VOIGTS-HOFFMANN et al. 2012). Paralelamente ocorre a formação do Complexo Ternário (*do inglês* TC – Ternary Complex), com a ligação de uma molécula de GTP, com o fator eIF2 e o tRNA iniciador ($\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$) que contém o aminoácido metionina. Por fim, o Complexo Ternário liga-se ao 40S com auxílio também dos fatores eIF1 e eIF1A, formando, então, o 43S PIC (FEKETE et al. 2005; PASSMORE et al. 2007).

Por último, ocorre o recrutamento do 43S PIC para o mRNA-eIF4F. A conexão entre estes dois complexos é estabelecida pela ligação física entre eIF4G e eIF3 (HINTON et al. 2007; VILLA et al. 2013). Agora, este novo e único complexo é denominado 48S. Uma vez estabilizado, o 48S começa a escanear a fita do mRNA

na direção 3' em busca do códon de início, o AUG (CIGAN et al. 1988). Quando este momento ocorre, a molécula de GTP é hidrolisada para GDP pelo fator eIF2, estimulado por eIF5, liberando os demais fatores da maquinaria (HINNEBUSCH e LORSCH 2012). Isso permite que a subunidade ribossomal maior 60S se ligue, finalmente, ao complexo 48S com auxílio do fator eIF6 (o qual protege a subunidade ribossomal maior 60S de possíveis ligações inespecíficas), formando então um ribossomo competente, agora denominado 80S. Após a formação do 80S e o início dos demais ciclos de elongação da tradução, outra fase de início é estruturada, o que permite a tradução de um mRNA por mais de um ribossomo ao mesmo tempo, o que é chamado de polissomo ou poliribossomo (PISAREV et al. 2007).

A próxima etapa do processo de tradução é denominado de elongação (RODNINA e WINTERMEYER 2009). Assim que o tRNA_i^{Met} estabiliza-se no sítio P (peptidil) do ribossomo, a elongação da cadeia polipeptídica é iniciada. O fator de elongação eEF1A liga-se a um tRNA aminoacilado correspondente ao segundo códon do mRNA na sua forma eEF1A-GTP e, assim, o posiciona no sítio A (aminoacil). Este evento leva à hidrólise do GTP e desligamento de eEF1A do ribossomo, permitindo a total acomodação do tRNA aminoacilado no sítio A. Rapidamente, o sítio catalítico ribossomal PTC (*do* inglês – Peptidyl Transferase Center) leva à formação da ligação peptídica e conseqüente formação da proteína. Em seguida, ocorre a movimentação do tRNA e mRNA para posicionar o próximo códon no sítio A com auxílio do principal fator de elongação da tradução, o eEF2. Além disso, eEF2 previne o movimento reverso do tRNA e mRNA após esta translocação (GAO et al. 2009; CHEN et al. 2012; DEVER e GREEN 2012).

Um outro fator designado como eIF5A foi inicialmente atribuído como um

fator de início de tradução (KEMPER et al. 1976). Entretanto, estudos mostram interações físicas entre eIF5A e o fator de alongação eEF2, revelando um possível papel na etapa de alongação (GREGIO et al. 2009; SAINI et al. 2009; DIAS et al. 2012). Além disso, foi descoberto que eIF5A promove a tradução preferencial de proteínas com resíduos de poli-prolina, os quais apresentam dificuldade estérica durante a tradução (DOERFEL et al. 2013; GUTIERREZ et al. 2013), novamente evidenciando que componentes da maquinaria podem atuar preferencialmente na tradução de uma subpopulação específica de mRNAs.

O processo de término da tradução inicia-se com o posicionamento do códon de terminação no sítio A do ribossomo. O fator de terminação eRF1 é responsável pela alta fidelidade de reconhecimento do códon e hidrólise do peptídeo do tRNA. Para a liberação do tRNA, bem como do peptídeo recém sintetizado, ocorre a participação do fator eRF3 (STANSFIELD et al. 1995; ZHOURAVLEVA et al. 1995; ALKALAEVA et al. 2006). Por fim, as subunidades ribossomais são recicladas (KAPP e LORSCH 2004).

Também existe um modelo de tradução de forma independente do m⁷Cap, que é mediado por estruturas únicas denominadas sítios internos para entrada de ribossomo (*do inglês* IRES – Internal Ribosome Entry Site). Este modelo requer um grupo reduzido de fatores de início de tradução e corresponde cerca de 5% de todos os eventos de tradução em uma célula eucariótica. As IRES têm frequentemente estruturas secundárias que promovem uma interação eficiente com a subunidade ribossomal 40S e, assim, permitem a iniciação da tradução sem todos os fatores de tradução canônicos. Portanto, a tradução independente de m⁷Cap representa uma importante via de tradução em condições de regulação negativa das vias normais

dependentes de m⁷Cap (SPIRIN 2009; JACKSON 2013).

1.2.2 As principais vias de sinalização que controlam a maquinaria de tradução

O controle da tradução tem um impacto fundamental nos níveis de proteína encontrados dentro da célula. Diversos fenômenos celulares podem afetar a eficiência da tradução, resultando em mais ou menos proteína codificada a partir de um mesmo transcrito. O início da tradução é a etapa mais controlada e pode ser regulada de forma precisa por vias de sinalização distintas.

Por exemplo, a quinase mTOR (*do inglês* – mammalian Target Of Rapamycin) é alvo *downstream* da via PI3K/AKT/mTOR. Esta via é estimulada por diversos ligantes extracelulares, como EGF (*do inglês* – Epidermal Growth Factor) (OJEDA et al. 2011) e insulina (RAFALSKI e BRUNET 2011). Um dos alvos da forma ativa de mTOR é a família de proteínas denominada 4E-BPs (SUNAVALA-OSSABHOY et al. 2004), proteínas que podem, de maneira reversível, impedir a ligação do fator eIF4E em eIF4G (na formação do complexo eIF4F), diminuindo os níveis globais de tradução dependente do m⁷Cap. Quando 4E-BPs são fosforiladas por mTORC1, elas perdem a capacidade de ligação química em eIF4E, reativando a tradução (MARTINEAU et al. 2014).

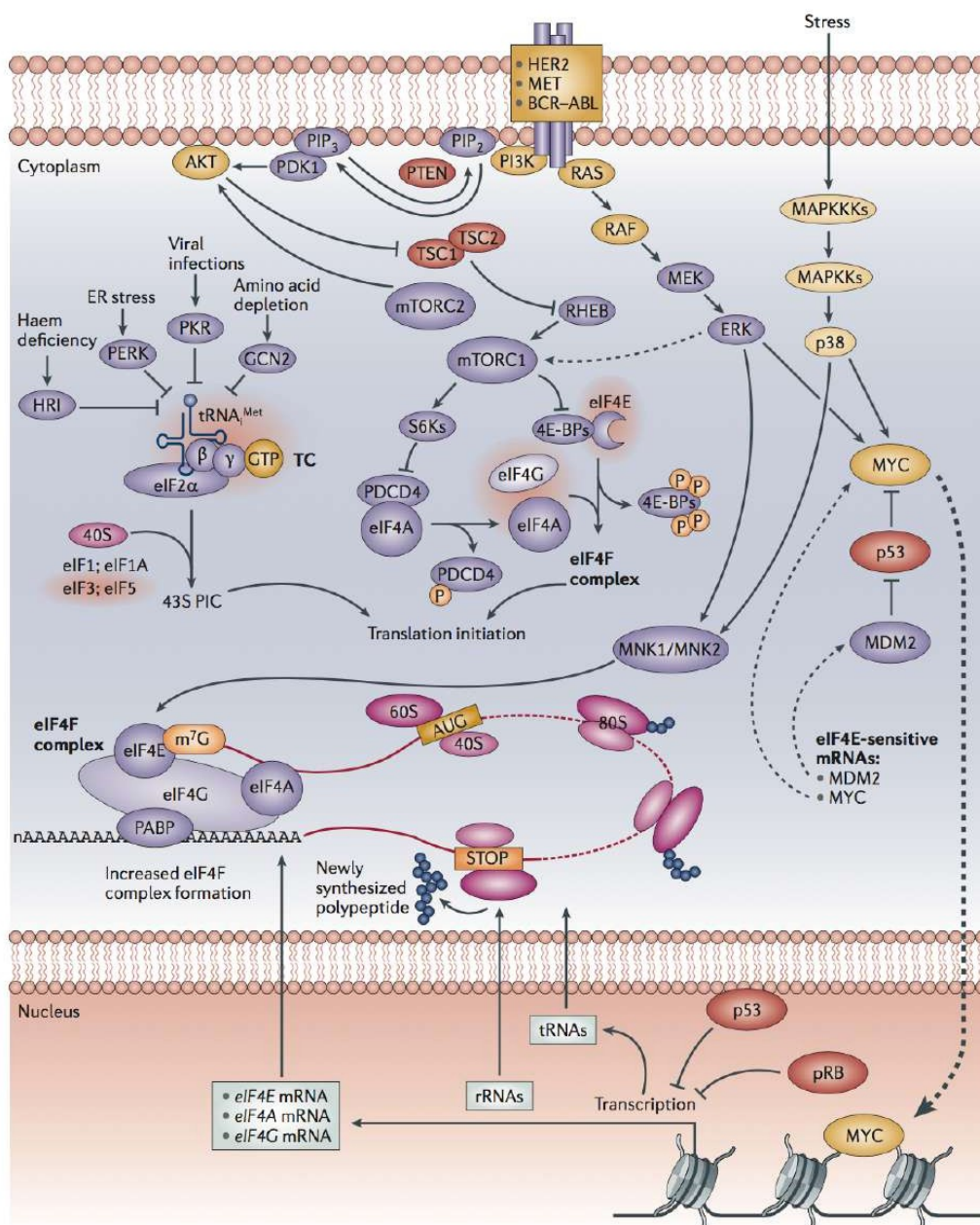
Outro alvo direto da quinase mTOR é a proteína S6K1 (SHIMA et al. 1998), cuja ativação estimula a síntese proteica por meio da fosforilação de diversas outras proteínas (MAGNUSON et al. 2012; BEN-SAHRA et al. 2013). Um dos alvos de S6K1 é a proteína PDCD4, um supressor da atividade de helicase do fator eIF4A (DORELLO et al. 2006). A fosforilação por S6K1 leva PDCD4 para degradação e,

consequentemente, deixa livre o fator de tradução para que o complexo de início eIF4F (eIF4E, eIF4G e eIF4A) seja estruturado.

O eixo RAS/RAF/MEK/ERK também exerce controle no início da tradução. RSK é um alvo *downstream* nesta via de sinalização e esta quinase pode fosforilar eIF4B. Este fator se liga em eIF4A, promovendo uma potente atividade de helicase deste fator. A atividade de helicase de eIF4A é vital para tradução de mRNAs com uma região 5'UTR rica em G/C, uma vez que esta característica confere, de uma maneira geral, estruturas secundárias ao mRNA que impedem o acoplamento da maquinaria de tradução de maneira eficiente. Proto-oncogenes, como c-myc e ciclina D1 somente conseguem ser traduzidos com a ativação de eIF4A. Interessantemente, eIF4A também pode ser ativado, de maneira mutuamente exclusiva, por outro fator denominado eIF4H. A atividade de eIF4A no desdobramento de estruturas secundárias em mRNAs é dependente da interação com seus parceiros físicos eIF4B ou eIF4H, novamente evidenciando que o controle traducional pode favorecer a expressão de um determinado grupo de mRNAs (SVITKIN et al. 2001; DEGEN et al. 2013).

Finalmente, outro evento envolvido no controle global da tradução é a fosforilação da subunidade α do fator eIF2. Este fator é alvo de quatro quinases: a proteína PKR, PERK, GCN2 e HRI. Cada uma delas responde, principalmente, a um tipo distinto de estresse celular. A quinase GCN2 responde a depleção de aminoácidos de cadeia ramificada; PERK é sensível a perturbações no retículo endoplasmático; HRI responde à privação do grupamento heme; e PKR é ativado pela presença de RNA de cadeia dupla. A fosforilação de eIF2 α por estas quinases inibe a atividade do fator eIF2B, reduzindo, assim, a formação do complexo ternário

(eIF2/GTP/tRNA^{Met}). Em geral, a fosforilação de eIF2 α representa uma resposta destinada a garantir a sobrevivência celular em relação a situações adversas. Uma vez que o estresse celular é cessado, a fosforilação eIF2 α é revertida, pois quando sustentada por longos períodos, leva a apoptose (BAIRD e WEK 2012). As principais vias de sinalização envolvidas no controle da tradução estão ilustradas na **Figura 4**.



Fonte: BAHT et al. (2015).

Figura 4 - As principais cascatas de sinalização que regulam a formação do complexo eIF4F estão representadas pela via PI3K/mTOR e a via de MAPK quinases. Proteínas codificadas por proto-oncogenes frequentemente mutados e genes supressores de tumor, nestas vias, estão ilustrados em amarelo e vermelho, respectivamente. À esquerda do esquema, estão representados os eventos que levam à fosforilação de eIF2 α . Também é mostrada a regulação transcricional da maquinaria de tradução pelo proto-oncogene *MYC*, que ativa a transcrição dos fatores eIF4E, eIF4A e eIF4G. O conjunto destas alterações difere entre as células tumorais, porém está invariavelmente ligado a um aumento desproporcional na tradução. Componentes da maquinaria de tradução que conduzem a uma transformação neoplásica, quando superexpressos, estão com sombreamento vermelho.

1.2.3 Descontrole traducional e o impacto no câncer de mama

Diversas vias de sinalização que regulam a tradução encontram-se desreguladas no câncer. Particularmente, nos tumores de mama, *PI3K*, por exemplo, encontra-se mutado em 36% de todos os casos, *MAPK* em 8%, *PTEN* em 3% e *AKT* em 2%. Além disso, o gene *HER2* está superexpresso por amplificação gênica em 15% de todos os casos. A superativação de *HER2* é capaz de ativar ambas as vias (RAS e PI3K), descontrolando os níveis traducionais e promovendo crescimento celular acelerado (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

Além da desregulação das vias bioquímicas, a alteração de expressão de alguns fatores de início de tradução também tem grande impacto na patologia do câncer de mama. Por exemplo, eIF4E é um fator fundamental descrito para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama (SORRELLS et al. 1998). A superexpressão deste fator está envolvida com autonomia celular para proliferação e sobrevivência através da inibição da apoptose de forma indireta (LARSSON et al. 2007). Além disso, a depleção de eIF4E da célula resulta no comprometimento de diversos mecanismos celulares fundamentais ao tumor mamário, como sensibilização

celular frente à alguns quimioterápicos como cisplatina, doxorrubicina e docetaxel (ZHOU et al. 2011). Também, eIF4E contribui com a tumorigênese, aumentando a tradução de mRNAs específicos, como ciclina D1, c-MYC e VEGF, que codificam para proteínas-chave no crescimento celular, angiogênese e sobrevivência (NASR et al. 2013). De fato, o controle celular existente entre eIF4E e a família de 4E-BPs é considerado um ponto de convergência entre vias de sinalização alteradas no câncer de mama e, por isso, pode ser considerado como um importante alvo terapêutico. Como proto-oncogene e mediador da síntese proteica, eIF4E pode ser considerado como um importante ponto de conexão entre tumorigênese e tradução nos tumores de mama.

Interessantemente, os tumores de mama inflamatórios apresentam um fenótipo que pode estar relacionado com a superexpressão de eIF4G. A superexpressão deste fator é capaz de orquestrar uma preferência em expressar mRNAs que são traduzidos de forma independente do m⁷Cap, resultando em angiogênese e crescimento. De acordo com este modelo, eIF4G, quando em excesso, aumenta de forma seletiva a tradução mediada por IRES de uma população de mRNAs que promove angiogênese e crescimento celular descontrolado (BRAUNSTEIN et al. 2007). Outros fatores de tradução também podem estar envolvidos na progressão do câncer de mama, entretanto o impacto global ou específico na tradução celular mediada por eles ainda não é completamente compreendido. O **Quadro 1** mostra um panorama do papel dos principais fatores de tradução aberrantemente expressos no câncer de mama.

Quadro 1 - Panorama dos principais fatores de tradução no câncer de mama.

Fator de tradução	Função celular	Papel no câncer de mama
eIF1	Auxilia na ligação da subunidade ribossomal 40S ao mRNA juntamente com eIF1A	eIF1 está envolvido na identificação do códon de início e pouco se sabe sobre envolvimento de eIF1 no processo tumoral. Entretanto, em pacientes RE positivos com doença avançada, houve associação significativa com benefício clínico e PFS para Altos níveis do mRNA de eIF1 (VAN AGTHOVEN et al. 2010)
eIF2	Unidade do complexo ternário (eIF2/GTP/tRNA ^{iMet})	As quinases PKR e PERK estão envolvidas no desenvolvimento proliferação do tecido mamário (ZANG et al. 2009)
eIF2B	Atua na formação de novos complexos ternários	A expressão reduzida deste fator já foi relacionada com redução do crescimento celular, formação de colônia e progressão tumoral em linhagens isoladas de tumores mamários (GALLAGHER et al. 2008)
eIF3	Arcabouço na formação do complexo 48S, interação com eIF4G e estabilização da subunidade ribossomal menor no mRNA	Altas expressões de eIF3 foram correlacionadas com alto grau tumoral, invasão e proliferação (GRZMIL et al. 2010) e com angiogênese e formação tumoral (CHEN et al. 2007).
eIF4A	Helicase componente do complexo eIF4F	Inibição de eIF4A foi relacionada com efeitos antiproliferativos e com redução na incidência de metástase pulmonar (CENCIC et al. 2009; NASR et al. 2013)
eIF4E	Ligação ao cap do mRNA e parte do complexo eIF4F	Superexpressão de eIF4E está classicamente relacionada à proliferação e evasão da apoptose em diversos modelos de câncer de mama (AVDULOV et al. 2004; LARSSON et al. 2007)
eIF4G	Maior unidade do complexo eIF4F responsável pela ligação em eIF4E e PABP para circularização do mRNA	Altas taxas de eIF4G foram associadas com câncer de mama inflamatório e com tumores Mamários altamente proliferativos

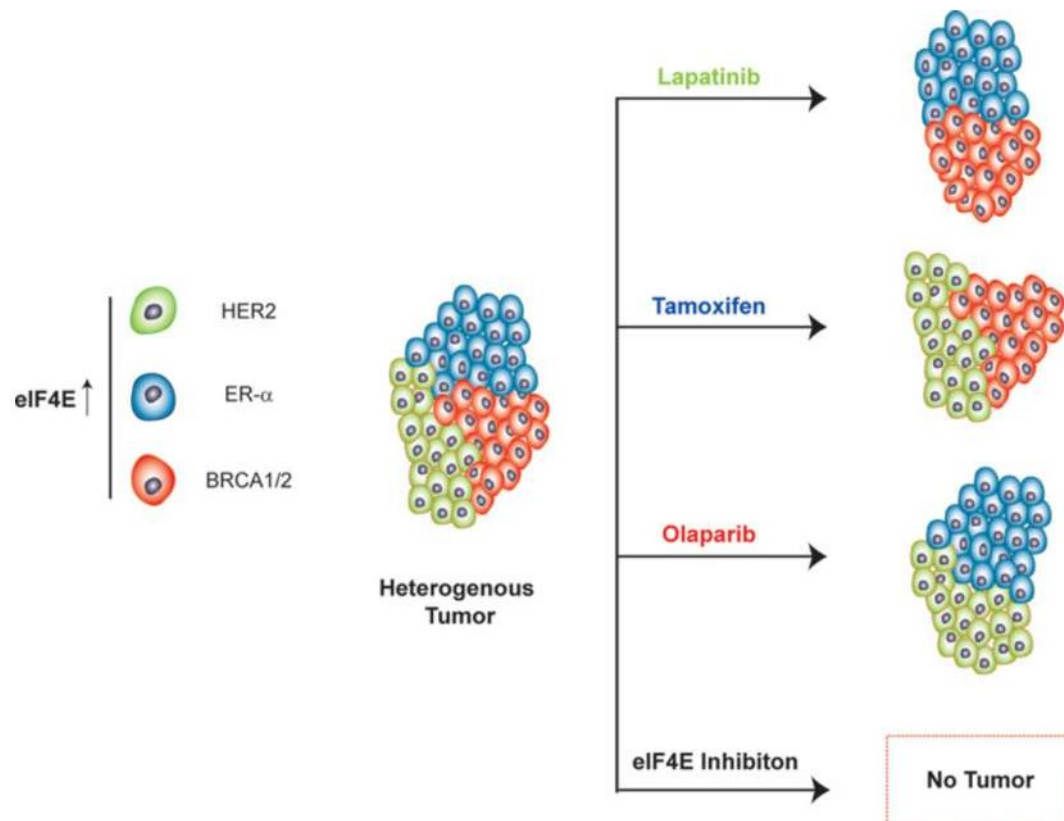
Fonte: BRAUNSTEIN et al. (2007)

Ao descrever-se a maquinaria de tradução em eucariotos, é possível notar a vasta quantidade de fatores limitantes e reguladores deste processo. Além disso, é possível perceber que a desregulação da síntese proteica está intimamente ligada ao processo carcinogênico, uma vez que o tumor necessita de uma quantidade maior de proteínas em meio ao descontrole do ciclo celular e índices proliferativos mais elevados em relação aos tecidos normais, assim como o aumento do produto de proto-oncogenes também está diretamente relacionado ao desenvolvimento oncogênico (RUGGERO 2013).

Analisando os fatores-chave na regulação da tradução, foi feita uma extensa busca na literatura acerca do envolvimento de alguns fatores com processos tumorais em células mamárias. Conforme descrito na introdução desta tese, o fator de início de tradução eIF4E é a única proteína da maquinaria com propriedades para interação física de ligação com o m⁷Cap. Esta característica conformacional faz com que eIF4E seja uma proteína essencial para viabilidade celular, envolvida na tradução global da maioria dos mRNAs que são traduzidos de forma dependente de *cap* e, quando depletado da célula eucariótica, reduz os níveis de tradução drasticamente (SIDDIQUI e SONENBERG 2015).

A superexpressão de eIF4E tem sido correlacionada com altos índices proliferativos, em modelos de câncer de mama, ao longo dos anos (PETTERSSON et al. 2011; PONS et al. 2011; AVDULOV et al. 2015; FAGAN et al. 2017). Além disso, é descrito na literatura que a depleção de 50% da quantidade de eIF4E, em modelo de camundongo geneticamente modificado, é considerado como fator protetor na formação de tumores, quando na presença de mutações em proto-oncogenes, como *KRAS* (TRUITT et al. 2015). Este fato, corrobora a hipótese que,

ao considerar-se a alta heterogeneidade dos tumores mamários, inibidores de eIF4E seriam fortes candidatos a um tratamento eficiente nas pacientes com esta patologia, como ilustrado na **Figura 5**.



Fonte: Adaptado de SIDDIQUI e SONENBERG (2015).

Figura 5 - Inibição de eIF4E na heterogeneidade do tumor. Um diagrama esquemático que ilustra uma versão simplificada da diversidade dentro de um tumor de mama hipotético heterogêneo. São apresentadas subpopulações de células que expressam HER2 (verde), RE (azul) ou apresentando mutações BRCA1/2 (vermelho). Em contraste, todas as células tumorais apresentam elevados índices de eIF4E. Os tumores contendo os alvos indicados são tratados na clínica pelos medicamentos correspondentes listados na figura. Foi hipotetizado que os inibidores diretos de eIF4E serão alvo de todos os tipos de células tumorais, independentemente da sua assinatura genética (classificação molecular)

Já eIF4G é uma proteína essencial para montagem do complexo eIF4F (eIF4E, eIF4G e eIF4A) e também para tradução dependente de *cap*. Entretanto, interessante, eIF4G também é descrito como um fator fundamental para

mRNAs cuja tradução seja mediada por IRES (SOSSIN e DYER 2013; REDONDO et al. 2013). Na introdução desta tese, foi mencionado que existe uma população de mRNAs traduzidos de forma independente de *cap*, como *MYC*, *CDK 11*, *BCL-2*, *VEGF* (CORNELIS et al. 2000; SHERRILL et al. 2004). Além disso, eIF4G já foi envolvido com câncer de mama em situações de hipóxia, nas quais a superexpressão deste fator tem papel fundamental para aumentar a tradução preferencial via IRES em mRNAs envolvidos com angiogênese e sobrevivência celular (BRAUNSTEIN et al. 2007). Também, a superexpressão de eIF4G e o papel em estimular a tradução de mRNAs via IRES, está envolvida na progressão no câncer de mama inflamatório. Foi identificado que eIF4G está envolvido no aumento da expressão de proteínas, como E-caderina e p120 catenina, que são essenciais para formação de êmbolos tumorais nesta patologia, por aumentar a interação célula-célula, ao invés da interação célula- estroma (SILVERA et al. 2009). Portanto, eIF4G tem um papel regulador da tradução geral por meio da formação do complexo eIF4F, entretanto, sua função celular em promover a tradução de mRNAs dependentes de IRES está relacionada com a formação de tumores e, mais especificamente, em processos tumorais em modelos de carcinomas mamários (SILVERA e SCHNEIDER 2009; DE LA PARRA et al. 2012; OCHNIK et al. 2016).

Por último, o fator eIF5A também é uma proteína essencial para viabilidade celular, entretanto sua depleção resulta em uma modesta diminuição na síntese proteica. Recentemente, este fator tem sido cada vez mais envolvido com a etapa de alongação da tradução e, mais especificamente, na alongação de um subgrupo específico de mRNAs, sugerindo seu envolvimento na tradução específica, e não global. eIF5A tem se demonstrado fundamental na alongação de proteínas que

contêm resíduos de poli-prolina (GUTIERREZ et al. 2013; PELECHANO e ALEPUZ 2017). Existe uma hipótese que estes mRNAs possam ser transcritos de proto-oncogenes, uma vez que este fator tem sido cada vez mais envolvido com diversos tipos tumorais (MATHEWS e HERSHEY 2015; BAO et al. 2015; FUJIMURA et al. 2015; YANG et al. 2016; NAKANISHI e CLEVELAND 2016) e com altos índices proliferativos e marcadores como Ki-67, em patologias como carcinoma de ovário (YANG et al. 2009) e de vulva (CRACCHIOLO et al. 2004).

Curiosamente, durante o breve levantamento bibliográfico apresentado nesta introdução, não foi possível identificar na literatura algum estudo que relacionasse a expressão conjunta destes fatores, eIF4E, eIF4G e eIF5A, especialmente em câncer de mama. Além disso, embora todos já tenham sido correlacionados com processos tumorais e em modelos da patologia de interesse desta tese, com exceção de eIF5A, também não foram observadas correlações com os subtipos moleculares de câncer de mama, assim como com dados clínicos obtidos de pacientes, comportamento histopatológico da doença e dados moleculares.

Desta forma, com todos os indícios apresentados decidiu-se escolher a translatômica como ferramenta de estudo para melhor compreender a expressão de mRNAs alvos do descontrole traducional no câncer de mama. Também, decidiu-se ter foco em fatores específicos como eIF4E, eIF4G e eIF5A, devido a existência de indícios na literatura com processos tumorais específicos, assim como a presença de uma grande oportunidade científica para a resposta de novas perguntas que ainda não haviam sido endereçadas.

1.3 TRANSLATÔMICA: ANÁLISE EM LARGA ESCALA POR UMA NOVA PERSPECTIVA

1.3.1 A translatômica

Tendo em vista a grande importância da caracterização molecular do câncer, os métodos de rastreamento em larga escala, chamados de “high-throughput”, têm sido amplamente utilizados. Para o câncer de mama, consórcios internacionais realizaram o sequenciamento de centenas de amostras, criando um catálogo completo de mutações somáticas, alterações no número de cópias de genes e níveis de expressão gênica da doença. Os estudos reproduziram a separação nos subtipos RE positivos e RE negativos e revelaram mutações mais frequentes em certos subtipos moleculares. Por exemplo, uma alta taxa de mutação em p53 foi encontrada nos subtipos basal-like e *HER2* positivos (superior a 70%), entretanto a proteína encontrada como mutada em um maior número de amostras classificadas nos grupos luminais foi PI3K (50% das amostras). Os estudos também demonstraram que o perfil de expressão gênica é muito variável entre o mesmo subtipo, fornecendo uma explicação molecular para o fato da resposta variável observada na clínica, com prognósticos variáveis e um curso heterogêneo da doença (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012; ELLIS et al. 2012; BANERJI et al. 2012; STEPHENS et al. 2012; SHAH et al. 2012; ELLIS e PEROU 2013).

No entanto, as técnicas de *high-throughput* mais utilizadas atualmente reportam níveis de expressão gênica através da identificação dos níveis globais de mRNAs. Entretanto, a expressão do mRNA nem sempre se traduz em proteína e as taxas de tradução gerais e específicas podem ser amplamente modificadas. De fato,

estudos mostram claramente que existe uma discrepância entre os níveis de mRNAs e proteínas (LARSSON e NADON 2008), evidenciando a significativa relevância do controle da expressão gênica em nível traducional.

A velocidade de tradução pode ser alterada através da modulação de quantos ribossomos se associam a cada transcrito, ou seja, o número de unidades traduzindo cada transcrito num determinado momento. O recrutamento do ribossomo exerce assim papel fundamental na regulação da eficiência de tradução (MARTINEZ-NUNEZ e SANFORD 2016). É possível estratificar a população de mRNAs com base no número de ribossomos ligados (o que é proporcional à taxa de tradução), através de uma abordagem bioquímica de preparação de poli(ribo)ssomos (MIKULITS et al. 2000). Durante a preparação dos polissomos, amostras de interesse são colocadas sobre um gradiente de densidade e ultracentrifugadas, o que faz com que os mRNAs que estejam ligados a vários ribossomos sedimentem mais rápido. A amostra é recolhida de maneira a isolar diferentes frações, contendo um número diferente de ribossomos ligados. Após o fracionamento bioquímico, técnicas de sequenciamento de última geração ou “microarrays” podem ser utilizadas para a identificação de cada mRNA purificado (LARSSON et al. 2010; LARSSON et al. 2011). Durante a análise de dados, a estimativa obtida a partir da fração de RNA polissomal precisa ser corrigida pelos níveis de transcrição basal. Isto porque a abundância de transcritos medida em cada fração será influenciada pelas diferenças na abundância do mRNA total. Usando uma amostra de RNA não separada bioquimicamente, uma estimativa da população de RNA total pode ser obtida e utilizada para corrigir a estimativa obtida a partir do RNA polissomal. Esta medida pode ser então usada para comparar diferentes amostras (LARSSON et al. 2013).

Nessa abordagem, genes que codificam proteínas integrais de membrana, secretadas, residentes no lúmen de organelas intracelulares ou de baixa representatividade não são perdidos (STITZIEL et al. 2004; DIEHN et al. 2006). Deste modo, o isolamento e detecção de mRNAs polissomais utiliza a sensibilidade das técnicas de genômica para, a partir de pouca quantidade de, amostra, obter um perfil de sequências que reflita a expressão de proteínas, constituindo o que é atualmente chamado **translatômica**.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudar o impacto do controle traducional em tumores invasivos da mama, avaliando, por um lado, o perfil de RNAs diferencialmente traduzidos, e por outro, alterações em mecanismos de controle da tradução que possam impactar diversos aspectos da tumorigênese.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Padronização de metodologia que permita a aplicação da translômica em amostras tumorais mamárias advindas de BioBanco
- 2 Aplicação da translômica em amostras de câncer de mama invasivo originadas do BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center
- 3 Estudos do impacto da expressão dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A no curso clínico dos tumores invasivos da mama

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em três partes principais, alinhadas com os objetivos específicos apresentados anteriormente: (1) desenvolvimento de uma nova metodologia para a translatômica, (2) aplicação da técnica em amostras do BioBanco, (3) análise da expressão de fatores de início de tradução. Vale a pena ressaltar que o projeto que abrange estes objetivos possui aprovação no comitê de ética em pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center, sob o número de registro 1844/13B. Cada capítulo contém a descrição de Material e Métodos utilizados, assim como uma explanação acerca dos resultados obtidos com devida interpretação sobre os achados deste projeto.

Por fim, a terceira parte deste capítulo contempla as análises de expressão proteica, por metodologia de imunohistoquímica, dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A. Esta avaliação foi feita em diversos TMAs (*do inglês* – Tissue

MicroArray) previamente construídos na instituição, somente com tumores de mama invasivos e que contemplassem os principais grupos moleculares (Luminal A, Luminal B, *HER2* e Triplo-Negativo). As informações obtidas foram correlacionadas com os diversos dados clínicos coletadas com levantamento de prontuários eletrônicos disponibilizados pela instituição. Este objetivo foi feito em colaboração com a aluna de doutorado Mayara Carolinne Silva Botelho (IQ – USP).

3.1 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA QUE PERMITA A APLICAÇÃO DA TRANSLATÔMICA EM AMOSTRAS TUMORAIS MAMÁRIAS ADVINDAS DE BIOBANCO

O primeiro capítulo desta seção, correspondente à padronização de uma nova metodologia que permitiu aplicar a translátômica em amostras de tecido humano congelado e está apresentado em forma de manuscrito já publicado. A metodologia clássica do perfil polissomal, com a utilização de um gradiente de sacarose linear, leva a separação do RNA em grande volume, tornando-se inconveniente em amostras com baixas quantidades de RNA. Por esta razão, foi desenvolvido um gradiente de sacarose não linear, o qual concentra os polissomos de interesse em um número reduzido de frações coletadas, reduzindo, portanto, o volume utilizado. A nova técnica possibilita o isolamento de RNA polissomal com qualidade e quantidade suficiente para implementação da técnica Smart-Seq2. Desta forma, torna-se possível o sequenciamento de RNA polissomal em amostras tumorais originadas de BioBanco. Este capítulo é apresentado na forma de artigo científico já publicado no dia 23 de outubro de 2017. O mesmo pode ser acessado de forma *online* no link: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx940>. A publicação encontra-se disponível na revista Nucleic Acids Research (NRA – fator de impacto 2017: 10,16) e está na forma de manuscrito nesta tese para facilitar a leitura.

Polysome-profiling in small tissue samples

Shuo Liang^{1,†}, Hermano Martins Bellato^{2,†}, Julie Lorent^{1,†}, Fernanda C. S. Lupinacci², Christian Oertlin¹, Vincent van Hoef¹, Victor P. Andrade³, Martín Roffé², Laia Masvidal^{1,*}, Glaucia N. M. Hajj^{2,*} and Ola Larsson^{1,*}

¹Department of Oncology-Pathology, Science for Life Laboratory, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden,

²International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil and ³Department of Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Received June 14, 2017; Revised August 21, 2017; Editorial Decision October 02, 2017; Accepted October 10, 2017

ABSTRACT

Polysome-profiling is commonly used to study translomes and applies laborious extraction of efficiently translated mRNA (associated with >3 ribosomes) from a large volume across many fractions. This property makes polysome-profiling inconvenient for larger experimental designs or samples with low RNA amounts. To address this, we optimized a non-linear sucrose gradient which reproducibly enriches for efficiently translated mRNA in only one or two fractions, thereby reducing sample handling 5–10-fold. The technique generates polysome-associated RNA with a quality reflecting the starting material and, when coupled with smart-seq2 single-cell RNA sequencing, translomes in small tissues from biobanks can be obtained. Translomes acquired using optimized non-linear gradients resemble those obtained with the standard approach employing linear gradients. Polysome-profiling using optimized non-linear gradients in serum starved HCT-116 cells with or without p53 showed that p53 status associates with changes in mRNA abundance and translational efficiency leading to changes in protein levels. Moreover, p53 status also induced translational buffering whereby changes in mRNA levels are buffered at the level of mRNA translation. Thus, here we present a polysome-profiling technique applicable to large study designs, primary cells and frozen tissue samples such as those collected in biobanks.

INTRODUCTION

Protein levels are modulated via a series of mechanisms including transcription, mRNA-splicing (1), -transport (2), -

localization (3), -stability (4), -translation (2) and protein-stability (5). Notably, mRNA translation is the most energy consuming process in the cell (6) and its tight control is therefore essential (7). Consistently, mRNA translation was suggested as the predominant post-transcriptional mechanism impacting protein levels (8,9) although the relative contribution of different mechanisms affecting protein levels is context dependent (10,11). Moreover dysregulation of translation is associated with pathologies as diverse as fibrosis (12), cancer (13) and neurodegenerative disease (14–17). Thus, there is a need to study translomes (i.e. the transcriptome-wide pool of efficiently translated mRNA) to obtain a more complete understanding of how gene expression is modulated in both health and disease.

Regulation of mRNA translation can be global, by affecting mRNAs transcribed from essentially all genes; selective, by targeting mRNAs from a gene subset; or specific, by affecting mRNA copies from a single gene (14,18). Studies of translomes can be used to explore the latter two contexts as global changes in translation cannot be assessed using relative quantification methods such as RNA sequencing (RNAseq) or DNA-microarrays (19). Translation can be divided into four phases: initiation, elongation, termination and recycling (20). Although the elongation phase can be regulated by e.g. cellular stress (21), most described modulation of translation occurs at the initiation step, where mRNAs are recruited to ribosomes (20,22). When translation is regulated via changes in initiation, a change in the proportion of all mRNA copies from a single gene that are efficiently translated is observed (19). Such changes appear to be mediated via two modes of regulation: a large change in translational efficiency from almost complete association to almost complete dissociation with polysomes (on-off regulation); or a less dramatic modulation of translational efficiency largely contained within polysomes (19). For example, following inhibition of the mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR), mRNAs harbouring a 5' Ter-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +46 8 524 81 228; Email: ola.larsson@ki.se
Correspondence may also be addressed to Glaucia Hajj. Tel: +55 11 2189 5000 (Ext. 2966); Email: ghajj@cipe.accamargo.org
Correspondence may also be addressed to Laia Masvidal. Tel: +46 8 524 81 228; Email: laia.masvidal.sanz@ki.se

[†]These authors contributed equally to this work as first authors.

minal Oligopyrimidine Tracts element (TOP-mRNAs) in their 5' un-translated regions (5'UTRs) show on-off regulation while mRNAs, e.g. encoding mitochondria-related proteins show a shift in translational efficiency while still largely being associated with polysomes (19). Importantly, both modes of regulation lead to a change in the proportion of mRNA associated with >3 ribosomes (19). This property underlies selection of mRNAs associated with >3 ribosomes to represent the pool of efficiently translated mRNA during polysome-profiling.

Polysome- and ribosome-profiling are commonly used to study translational efficiency (18). Polysome-profiling involves isolation of cytosolic extracts followed by sedimentation in a linear sucrose gradient (commonly 5–50% sucrose). During centrifugation, mRNAs sediment according to how many ribosomes they associate with and, following fractionation, efficiently translated mRNAs (i.e. those fractions containing mRNA associated with >3 ribosomes) can be identified and pooled. The mRNA-pool is then quantified using either DNA-microarrays or RNAseq to derive data on translational efficiency. The >3 ribosome cutoff for isolation of efficiently translated mRNA could potentially result in that mRNAs whose change in translational efficiency does not involve a transition across this threshold cannot be identified. Detailed studies of mTOR sensitive translation indicate that many mRNAs will shift across the >3 ribosome cutoff (19). Moreover, as ribosome association is normally distributed (19), even a shift in mean ribosome association from 1 to 3 ribosomes will involve a change in the proportion associated with >3 ribosomes (i.e. as a result of the shift of the tails of the distributions). For the same reason, shifts from e.g. 5 to 10 ribosomes also involves a small shift in the amount of mRNA associated with >3 ribosomes. Thus selection of >3 ribosomes to represent efficiently translated mRNA has an underpinning for studies of mammalian cells but it cannot be excluded that some shifts cannot be observed (those largely occurring within very high ribosome association). During ribosome-profiling, ribosome-protected fragments (RPFs) are generated by applying a mild RNase treatment and isolated using gel purification (23). RPFs are then identified and quantified using RNAseq to reveal nucleotide resolution ribosome location. Such data is most commonly used to decipher patterns of ribosome positioning (24,25), but can also be used to assess changes in translational efficiency.

Thus, in contrast to polysome-profiling where efficiently translated mRNAs associated with >3 ribosomes are quantified (i.e. an mRNA perspective), ribosome-profiling quantifies ribosome-association (i.e. a ribosome-perspective). We recently showed that this leads to a bias during ribosome-profiling when mRNAs showing large changes in translational efficiency and those showing smaller shifts contained within polysomes are regulated under the same condition. Under these settings ribosome-profiling will, to a larger extent as compared to polysome-profiling, bias towards identification of abundant mRNAs showing larger changes as differentially translated (26). This difference in bias between polysome- and ribosome-profiling originates from that, during ribosome-profiling, translational efficiency is indirectly inferred by the number of RPFs, and thus the magnitude of the shift in ribosome association is

directly proportional to the fold-changes estimated. In contrast, during polysome profiling, translational efficiency is directly estimated from amounts of efficiently translated mRNAs associated with >3 ribosomes which results in a less pronounced bias (26). One limitation of polysome-profiling is that information regarding which part of the mRNA is translated is lacking. Indeed, some mRNAs such as SLC45A4 can shift between translating the main open reading frame (ORF) to an upstream ORF (uORF) (27). Such changes in ribosome location can only be resolved using ribosome profiling. Ribosome-profiling can in turn not be used to link changes in translational efficiency to transcription start site usage as untranslated regions (UTRs) are degraded during isolation of RPFs (19). In contrast polysome-profiling allows for exploration of the impact of 5'UTRs on translational efficiency (19). Thus, polysome- and ribosome-profiling are complementary methods necessary to enhance our understanding of how translational efficiency is modulated where polysome-profiling is preferred for unbiased studies of changes in translational efficiency.

A technical challenge during polysome-profiling, however, is that the pool of efficiently translated mRNA is collected in a large volume (often >3 ml) spread across 5–10 fractions. Such RNA is commonly isolated from each fraction separately and pooled during re-suspension of purified RNA pellets. For small samples, however, such extensive dilution is problematic as it may cause sample loss. Moreover, isolation of RNA from many fractions is labor intensive and, in larger experimental setups (e.g. large *in vitro* experiments or studies of clinical cohorts involving hundreds of samples resulting in thousands of fractions that need to be pooled), may introduce a risk of mistakes such as erroneous pooling of fractions and sample mislabeling. Therefore, approaches simplifying collection of efficiently translated mRNAs (i.e. associated with >3 ribosomes) are warranted. Herein, we describe an optimized non-linear sucrose gradient which collects efficiently translated mRNA (associated with >3 ribosomes) in only one or two fractions to reduce sample handling 5–10-fold and time needed for RNA extraction by 10–20-fold. By coupling isolation of such mRNA with RNAseq methods developed for single-cells, we show that it is possible to derive data on translational efficiency from small tissue samples such as those collected in biobanks. Importantly, this approach produces very similar data on translational efficiency as compared to the standard linear gradient approach (28). Thus, polysome-profiling can now be applied to small samples from tissues or primary cells where RNA amount is limited.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cytosolic lysates from cell lines

HCT-116 p53^{+/+}, HCT-116 p53^{-/-} (kindly provided by Galina Selivanova, Karolinska Institutet) and MCF7 (ATCC HTB-22TM) cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (Gibco, Life Technologies). Briefly, cells (1 × 10⁶) were seeded in 15-cm cell culture dishes (Corning), harvested at 80% confluency (HCT-116 p53^{+/+} and p53^{-/-} cells were also serum starved [0.1% fetal bovine serum for 16

h prior to harvest]), lysed in hypotonic lysis buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 100 µg/ml cycloheximide, 2 mM DTT, 0.5% Triton, 0.5% sodium deoxycholate; all from Sigma Aldrich) and the cytosolic extract was loaded onto the sucrose gradient. A detailed protocol described previously (28) was applied with the modification that instead of adding cycloheximide to the media, the cell media was discarded, plates were placed on ice and immediately washed in an ice-cold solution of 1× phosphate-buffered saline (PBS) and cycloheximide (100 µg/ml; Sigma Aldrich).

Preparation of cytosolic lysates from tissues

All breast cancer samples were collected in the A.C. Camargo Cancer Center biobank (São Paulo, Brazil) under informed consent (ethical permission 1844/13). To prevent tissue thawing and subsequent RNA degradation, all materials including tools and plastics were kept in liquid nitrogen during sample processing. Tissues were pulverized using a BioPulverizer (United Laboratory Plastics) followed by grinding in a liquid nitrogen-proof container until a fine powder was obtained. The powder was collected and kept on dry ice or stored at -80°C. A modified hypotonic lysis buffer with a 10-fold higher concentration of cycloheximide (as compared to above) was used. Also the RNase inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen) was replaced by Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega). To prevent clogging, a modified 1000 µl tip (cut to get a wider entry channel) was used to add 500–1000 µl (depending on the size of the tissue sample) ice-cold lysis buffer to the previously collected powder and mixed until homogenization. The sample was further homogenized using an ice-cold Dounce homogenizer (60 strokes using both the loose and tight pestle) in the presence of 0.5% Triton and 0.5% sodium deoxycholate. The homogenate was centrifuged at maximum speed (21 500 RCF) for 2 min at 4°C in a table top centrifuge and 50 µl supernatant was collected and diluted in 450 µl of nuclease-free water (referred to as cytosolic RNA). TRI-reagent® (Sigma Aldrich) was added and cytosolic RNA samples were stored at -80°C. The remaining cytosolic lysate was immediately loaded on sucrose gradients.

Preparation of optimized non-linear sucrose gradients

A 5X gradient buffer (100 mM HEPES pH 7.6, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂; all from Sigma Aldrich) was used to prepare sucrose solutions needed for the gradient: 5% (w/v), 34% (w/v) and 55% (w/v) (1× final concentration of gradient buffer [v/v] adjusted with water). A gradient cylinder (BioComp) was used to draw a line on each centrifuge tube at the highest level of the cylinder (corresponds to about 5.5 ml when using the Open-Top Polyclear Centrifuge Tubes [14 × 89 mm, SETON Scientific, Part No. 7030]). A 1000 µl pipette was then used to add 2 ml of the 5% sucrose solution to the tube. Then, a syringe with a layering needle (BioComp) was used to add the 34% sucrose solution at the bottom of the tube (i.e. below the 5% sucrose solution) until the surface of the 5% solution reached the drawn line. Finally, a 55% sucrose solution was added from the bottom of the

tube until the interface between the 34% and 55% solutions reached the drawn line. The tubes were then capped with rate zonal caps (BioComp) and stored at 4°C for 2 h before use (to standardize the time between gradient preparation and loading of samples). All reagents were nuclease-free.

Preparation of linear sucrose gradients

The linear gradients were prepared as described (28).

Sample loading onto sucrose gradients and fractionation

First, 500 µl of sucrose solution was removed from the top of the gradient without disturbing gradient composition. The cytosolic lysate (~500 µl) was then layered on the surface of the gradient. To precisely balance the samples for ultracentrifugation we used 1× hypotonic lysis buffer when needed. The samples were centrifuged at 209 815 RCF for 2 h at 4°C in a SW 41 Ti rotor and a Beckman Coulter Ultracentrifuge Optima L-90K. Samples were eluted using either the gradient station (BioComp) or the Biologic LP pump (Bio-Rad) coupled to a Model EM-1 Econo UV detector (BioRad). Fractions (~500 µl) were collected with either a Piston Gradient Fractionator (BioComp) coupled with a fraction collector (Gilson) or a model 2110 fraction collector (Bio-Rad). The precise location of the fractions along the UV-tracing was monitored using either the gradient profiler v1.25 (BioComp) software or the LP Data View v1.03 (Bio-Rad). TRI-reagent® was immediately added to each fraction and fractions were kept on ice prior to storage at -80°C.

RNA extraction

For the optimized non-linear gradient, fractions containing the center of the peak and the fraction towards the bottom of the centrifugation tube (referred to as fractions 0 and +1 in the results section) were pooled and RNA was extracted using TRI-reagent®. For cell lines profiled using linear gradients, fractions corresponding to mRNA associated with >3 ribosomes (fractions 17–25 for the current setup, resulting in 9 tubes with a volume of ~500 µl each) were extracted separately using TRI-reagent® (according to the protocol of the manufacturer) and then pooled during resuspension of RNA pellets. RNA extraction was performed differently depending on the source of the RNA (cell line or tissue sample). RNA from cell lines was extracted using TRI-reagent® and further purified with RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) according to manufacturer's recommendations. For tissue samples, the extraction protocol was modified to maximize the amount of RNA recovered: After standard phase separation with chloroform, the upper aqueous phase was transferred to a mixture of 2 volumes of ethanol 99.5% and linear acrylamide (15 µg/ml; Life Technologies). The mixture was centrifuged at 4°C for 40 min in a table top centrifuge at maximum speed (21 500 RCF) and the pellet was dissolved in 100 µl of RNase free water. The RNA was further purified using the RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. RNA quantity was measured by target-specific fluorescence (Qubit, Life Technologies) and its quality assessed

with on-chip electrophoresis using an Agilent Bioanalyzer 2100. The latter applies an algorithm to assign an RNA integrity number (RIN) to each sample. An RIN of 10 indicates perfectly intact RNA.

Preparation of smart-seq2 RNAseq libraries and sequencing

Smart-seq2 was performed as previously described (29) using 10 ng (when possible, otherwise less) of RNA as starting material from five tissue samples (cytosolic RNA and polysome-associated RNA isolated using the optimized non-linear gradient) and four biological replicates of HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} cells serum starved (0.1% fetal bovine serum) for 16 h (cytosolic RNA, polysome-associated RNA isolated using the optimized non-linear gradient and polysome-associated RNA isolated using the linear gradient). Quality of RNAseq libraries was evaluated by on-chip electrophoresis using an Agilent Bioanalyzer 2100. Sequencing was performed on RNAseq libraries from cell lines and tissues separately. Prior to sequencing, all RNAseq libraries were adjusted to a concentration of 10 nM and then pooled, clustered using cBot clustering and sequenced on the HiSeq2500 platform (HiSeq Control Software 2.2.58/RTA 1.18.64, Illumina) with a 1 × 50 bases setup using 'HiSeq SBS Kit v4' chemistry. After each cycle, image analysis and base calling was performed using the CASAVA software suit. Technical quality of the RNA sequencing was assessed using MultiQC (30).

Analysis of RNAseq data

RNAseq reads from the breast cancer tissues and 4 biological replicates of serum starved HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} cells were mapped to the human reference genome GRCh38 using Bowtie (31) (settings: -a -m 1 -best -strata -n 2 -l 28). The rpkmforgenes script (32) was used to quantify gene expression (with options -readCount, -fulltranscript and -onlycoding) based on RefSeq annotation. The reads per kilobase per million mapped read (RPKM) output from the rpkmforgenes script was used to assess quality of breast cancer RNAseq libraries. For analysis of HCT-116 cells, genes with zero count(s) or overlapping gene variants were excluded from the analysis leading to a total of 8675 quantified genes. Raw counts were scaled using TMM normalized library sizes (33) and log₂ counts per million were computed using the voom function of the limma R package (34). To explore whether the two gradient methods led to similar gene expression patterns, principal component analysis was performed after centering per gene. Each sucrose gradient method was then considered separately to assess differential expression of polysome-associated mRNA between HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} cell lines. Differential expression analysis was performed using t-tests applying RVM (Random Variance Model) (35), including the replicate number as factor in the models as implemented in the anota2seq R package (available at Bioconductor). P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg (BH) method (36) and a false discovery rate (FDR) < 0.1 was considered significant. The correlation of log₂ fold changes between HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} obtained using linear and

optimized sucrose gradients was assessed using the Spearman rank correlation coefficient. The different modes of regulation of gene expression associated with p53 status were then identified using the optimized gradient data. To this end, polysome-associated mRNA from optimized non-linear sucrose gradients and cytosolic mRNA data were re-normalized as described above. A previously described gene signature of p53 transcriptional targets (37) was used to characterize expected differences between HCT-116 p53^{+/+} versus HCT-116 p53^{-/-} cells. Anota2seq allows for identification of differences in translational efficiency affecting protein levels and buffering. The replicate number was included as a covariate in the linear models. Unrealistic models of differential translation and buffering were excluded (the filtering criteria in the anota2seqSelSigGenes function were as follows: maxSlope = 1.5, minSlope = -0.5, deltaPT = log₂(1.2), deltaP = log₂(1.2) for translation and maxSlope = 0.5, minSlope = -1.5, deltaT = log₂(1.2), deltaTP = log₂(1.2) for buffering. Genes with an FDR < 0.25 (a relaxed FDR threshold was used to obtain a sufficiently large number of identifiers in each regulatory pattern to allow for sensitive Gene Ontology [GO] enrichment analysis) were selected for GO enrichment analysis. Only GO terms (from the Biological Processes ontology) with 5 to 500 genes were considered for hypergeometric tests using Gostats (35) where 'conditional' was set to FALSE (the structure of the GO graph is not considered in the tests). Only processes annotated to at least five genes in a regulatory pattern were considered. The significant GO terms (FDR < 0.05) of each set (translation up, translation down, buffering up, buffering down, abundance up [i.e. congruent up-regulation of cytosolic and polysome-associated mRNA levels] and abundance down) were visualized in a heatmap (row dendrogram shows unsupervised clustering using default method of the gplots::heatmap.2 function) (36). All analyses were done using R version 3.3.1.

RESULTS

Design of an optimized non-linear sucrose gradient for isolation of efficiently translated mRNA

Because polysome-profiling with linear gradients requires extraction of RNA from many fractions per sample to isolate efficiently translated mRNA (Figure 1A), we considered alternative approaches. As many mRNAs show continuous shifts in translational efficiency within polysomes, pelleting ribosomes would not allow for estimates of their changes in translational efficiencies as such mRNA would be pelleted when associated with at least 1 ribosome. Instead we reasoned that a high percentage sucrose solution below an intermediate concentration sucrose solution could potentially enrich for efficiently translated mRNAs (associated with >3 ribosomes) at the surface of the high percentage sucrose – if the optimal sucrose concentrations were identified. This would allow for elution of efficiently translated mRNA in a smaller volume as compared to the standard linear gradient. While 55% sucrose essentially halts polysome sedimentation, we searched to identify a second sucrose concentration that would allow for such enrichment at the 55% sucrose surface. We therefore examined the linear relationship between the log₂ number of associated ri-

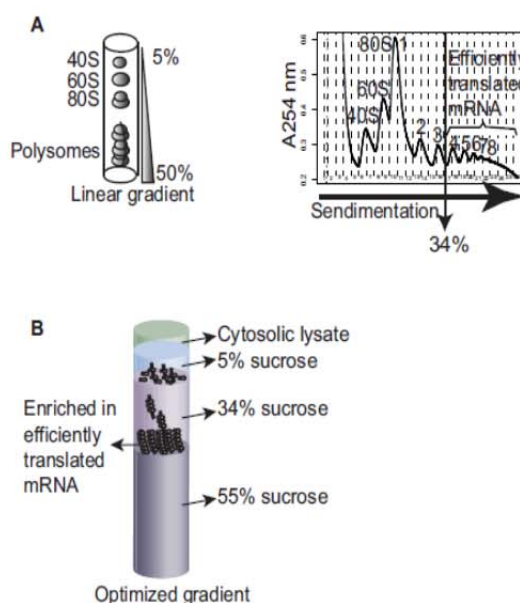


Figure 1. The linear and optimized non-linear gradients. (A) Polysome profiling using a linear 5% to 50% sucrose gradient. Cytoplasmic RNA is extracted and loaded on the linear gradient. Following ultracentrifugation, 40S and 60S ribosome subunits, the 80S monosomes, and polysomes are separated (schematics show UV tracing at 254 nm across the sucrose gradient). Efficiently translated mRNA is isolated from polysome-fractions containing mRNA associated with more than 3 ribosomes. This corresponds to a sucrose concentration of 34%. (B) The optimized non-linear sucrose gradient is made of layers of 5%, 34% and 55% sucrose. The purpose is to collect mRNA associated with more than three ribosomes at the surface of the 55% sucrose solution.

ribosomes and sedimentation distance (19). This allowed us to calculate the sucrose concentration that separates mRNAs associated with three ribosomes from those associated with four ribosomes in a linear gradient (Figure 1B; equals to 34% sucrose). To facilitate entry into the gradient, we added a third sucrose layer of 5% sucrose on the top of the 34% sucrose. We next attempted to determine the appropriate volumes of each of the sucrose layers. The objective was to position the surface of the 55% sucrose close to the top of the tube (to reduce time needed for elution) while still allowing a sufficient volume of 34% sucrose for good separation between efficiently (>3 ribosomes) and less efficiently translated mRNA. A highly reproducible approach for generating layers of sucrose is to start by adding the lowest concentration of sucrose solution to the tube and then add increasingly higher sucrose concentrations at the bottom of the tube; thereby displacing the lower concentration sucrose solution(s) towards the top of the centrifuge tube (28). While the first layer of 5% sucrose can be added by volume directly to the tube, additional volumes for the remaining layers are best determined by monitoring the interface between layers and let these reach a certain position in the tube. It is essential that this position can be reproducibly indicated on the tube and we therefore used the same approach as when making a linear gradient using the BioComp gradient maker, whereby a cylinder is used to indicate the desired level on the tube (28). Our initial test of the optimized non-linear gradient indicated separation of

40S, 60S ribosomal subunits and the 80S monosome followed by a peak at the interface between the 34% and 55% sucrose solutions (Figure 2A).

Reproducible isolation of efficiently translated mRNA using the optimized gradient

We noticed that the width of the peak at the interface between the 34% and 55% sucrose layers increased with the time between preparation of the gradient and centrifugation of the sample, consistent with that a local gradient is formed at the interface between the 34% and 55% sucrose solutions. We therefore standardized the time between preparation of the gradient and layering of the sample to 2 h (which is sufficient to prepare lysates to load onto the gradient). We next sought to explore the nature of the fractions surrounding the large peak at the 34% and 55% sucrose interface to assess whether this peak indeed is enriched for mRNA associated with >3 ribosomes. To this end, we used a large batch of cells (12 plates [15 cm] of MCF7 cells) and sedimented their lysate on the optimized non-linear gradient. The major area of the peak between the 34% and the 55% sucrose was spread across 3 fractions (Figure 2A). We designated the fraction containing the center of the peak as 0 and those toward the 34% sucrose as -1 (etc.) while those toward the 55% sucrose as +1 (etc.; Figure 2B). The vast amount of RNA used as input allowed us to collect five fractions surrounding the peak between the 34% and the 55% sucrose solutions and dilute these 7-fold to enable a run of

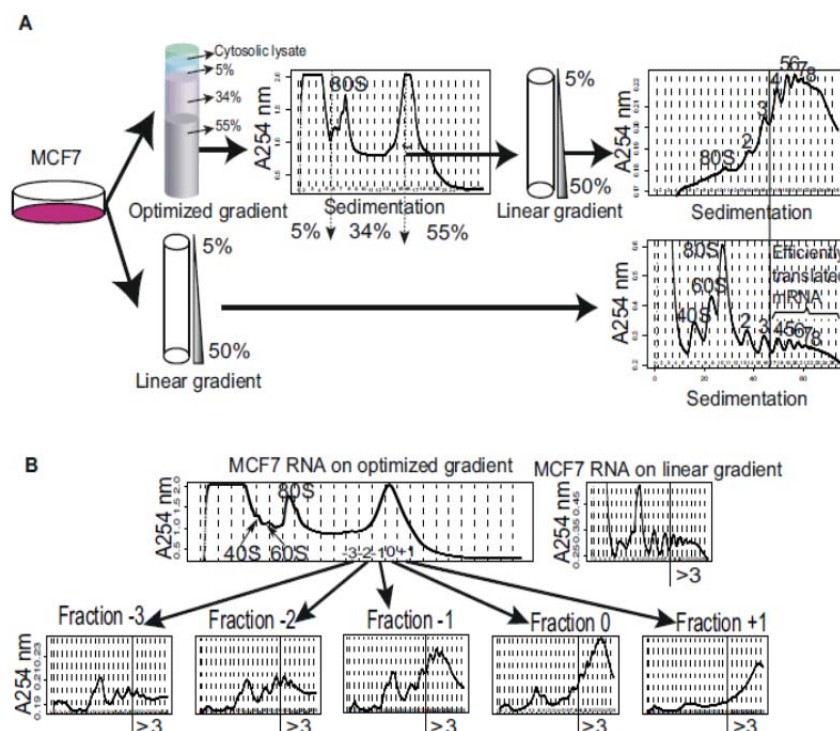


Figure 2. Identification of fractions from the optimized non-linear sucrose gradient that reproducibly contain mRNA associated with >3 ribosomes. (A) Cytosolic lysates from MCF7 cells were sedimented on an optimized non-linear sucrose gradient or a linear sucrose gradient in parallel. Subsequently, the nature of the large high peak from the optimized non-linear sucrose gradient was explored using a linear sucrose gradient which indicated a strong enrichment of mRNA associated with >3 ribosomes (compare upper right tracing to lower right tracing). The positions of the sucrose layers for the optimized non-linear gradient are indicated by arrows in the tracing. (B) Multiple fractions from the optimized non-linear gradient were evaluated on linear gradients similar to (A). The fraction at the center of the peak was designated 0 and fractions towards the right or left of fraction 0 were assigned positive or negative numbers, respectively. Shown is also the profile from a linear gradient processed in parallel. The vertical lines indicate fractions containing >3 ribosomes (designated ' >3 ' in figure).

each fraction separately on the standard 5–50% linear sucrose gradient (diluted to prevent samples from sinking into the linear gradient; Figure 2A). In addition, we generated a new cytosolic lysate (from 2 additional plates of MCF7 cells cultured in parallel with those used for the non-linear gradient) and loaded this on a linear gradient as control. As shown in Figure 2B, fraction 0 and +1 are strongly enriched for mRNA with >3 ribosomes while fraction -1, although still enriched for efficiently translated mRNA, show relatively more mRNA associated with <3 ribosomes. This pattern was observed in two additional independent experiments (Supplementary Figure S1). We therefore concluded that collection of fractions containing the center of the peak (i.e. 0) and the one further towards the bottom of the tube (i.e. +1) allows for isolation of a pool of mRNA that is strongly enriched for those associated with >3 ribosomes. This allows collection of efficiently translated RNA in just two fractions. After pooling these fractions (i.e. 0 and +1) and splitting them into one sample for processing and one

sample as backup, the procedure allows for downstream processing of a single tube containing efficiently translated mRNA.

The optimized non-linear gradient allows for consistent isolation of high quality RNA

A concern is that application of the optimized non-linear gradient leads to a reduction in the amount of isolated efficiently translated mRNA. To assess this, and to validate that high quality RNA can be reproducibly obtained, we used two cell lines that differ in their p53 status (HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-}) (Supplementary Figure S2A). We serum-starved the cells (16 h) as translation is commonly modulated during cellular stress and this setup would allow us to assess whether p53 status affected such responses. Serum starvation had a comparable effect on global translation for the two cell lines as judged by a similar reduction in polysome-associated RNA coupled with an increase in 80S and free ribosome subunits (Supplementary Figure

S2B). To allow for a rigid comparison between the standard linear gradient and the optimized non-linear gradient, we prepared cytosolic lysates from six plates (15 cm) from each cell type and divided the lysates equally between the optimized non-linear gradient and the linear gradient. We then collected fractions corresponding to mRNA associated with >3 ribosomes from the linear gradient and peak 0 and +1 from the optimized non-linear gradient. We repeated the experiment four times and measured the RNA quantity. The optimized non-linear gradient and linear gradient allowed for isolation of similar amounts of efficiently translated mRNA (Figure 3A). Assessment of the quality of extracted mRNA by RNA Integrity Number (RIN; Agilent Bioanalyzer) showed that both gradients allow for consistent isolation of essentially perfectly intact RNA (RIN > 9.5; Figure 3B). Thus, the optimized non-linear gradient and linear gradient show similar performance in terms of quality and quantity of the isolated efficiently translated RNA.

The optimized non-linear gradient and the linear gradient generate similar data on translomes

Ideally, data on translomes from the optimized non-linear gradient should be similar to those obtained using the standard approach employing linear gradients. To evaluate this, we determined translomes from serum starved (16 h) HCT-116 cells with and without p53 (as described above). To mimic a situation observed in tissue samples or primary cells, where obtained RNA amounts are often limited, we employed smart-seq2 developed for single-cell RNAseq (29) and used 10 ng of RNA as input. Smart-seq2 libraries were prepared using efficiently translated RNA obtained using linear gradients and optimized non-linear gradients; and cytosolic RNA as input. Following sequencing and data processing, we used principal component analysis to explore the major sources of variation in the data set. Absence of a highly ranked PCA component (by percentage of explained variance) showing differences between techniques used to prepare efficiently translated RNA would indicate that methods are comparable. As expected during analysis of polysome-profiling data, the first component capturing the main source of variance (52.1%) relates to RNA source such that cytosolic mRNA samples separate from polysome-associated mRNA samples. The second (16.7% of the variance) and third (6.1% of the variance) principal components separate samples according to replicate (notably the need to adjust for run-bias during analysis was recently identified (12)) and p53 status, respectively (Figure 4A). Thus, the absence of a highly ranked component showing differences between the optimized non-linear gradient and the linear gradient is consistent with that gradients produce similar data on translomes. To further substantiate this observation, we compared gene expression between HCT-116 p53^{+/+} and p53^{-/-} cells using data from polysome-associated mRNA isolated from the optimized non-linear sucrose gradient or the linear gradient separately. At an FDR threshold of 0.1, the optimized gradient approach was associated with more differential expression as compared to the linear gradient method (Figure 4B). Moreover, nearly all mRNAs identified by the linear gradient

were also identified by the optimized non-linear gradient (Figure 4C). Furthermore, the fold-changes obtained between HCT-116 p53^{+/+} and p53^{-/-} cells when applying the two approaches showed high correlation (Spearman coefficient: 0.74, Figure 4D). Consistently, the difference between the two techniques was the obtained FDRs rather than the fold changes such that lower FDRs were obtained when using the optimized non-linear gradient (Figure 4E). This is consistent with that the optimized non-linear gradient generated data of lower variance as compared to the linear gradient. We therefore conclude that the optimized non-linear gradient will provide similar data on translomes as compared to the standard linear gradient.

p53 status affects gene expression via multiple mechanisms including translational buffering

Next we sought to determine how p53 status affects gene expression under serum starvation at multiple levels including mRNA abundance (i.e. congruent changes in cytosolic and polysome-associated mRNA levels—which is consistent with altered transcription or mRNA stability); and translational efficiency affecting protein levels (i.e. a larger change in polysome-associated mRNA as compared to cytosolic mRNA) or buffering (wherein polysome-associated mRNA levels remain largely unchanged despite altered cytosolic mRNA levels). Translational buffering is distinct in the sense that it acts to maintain protein levels constant while the former two modes of regulation will influence protein levels. The recently developed anota2seq algorithm efficiently identifies and separates these three regulatory modes and was employed for analysis. As expected, genes whose transcription was previously identified as sensitive to p53 activity (37) showed increased cytosolic mRNA levels in p53^{+/+} as compared to p53^{-/-} cells (Figure 5A). Interestingly, changes in polysome-associated mRNA quantified from the optimized non-linear sucrose gradient were more abundant, as judged by the number of mRNAs showing low FDRs for p53-status dependent expression, compared to changes in cytosolic mRNA levels (Figure 5B). Consistently, more mRNAs showed modulation in translational efficiency affecting protein levels (682 mRNAs) as compared to changes in mRNA abundance (438 mRNAs; Figure 5C; Supplementary Table S1). Intriguingly many changes in cytosolic mRNA levels were buffered at the level of mRNA translation (373 mRNAs; Figure 5C; Supplementary Table S1). Thus, the optimized non-linear gradient in combination with Smart-seq2 and anota2seq analysis efficiently interrogates the impact on p53 status on multiple gene expression programs and highlights a key role of mRNA translation in regulating gene expression under cellular stress induced by serum starvation. To gain insights into whether different modes of regulation target distinct cellular functions (i.e. a division of labor pattern) or whether there is a large overlap with regards to which functions are affected, we searched for an over-representation of genes with shared functions as defined by the gene ontology consortium (38). Indeed, mRNAs that showed congruently increased cytosolic and polysome-associated mRNA levels in p53^{+/+} cells were enriched for functions including those related to extracellular matrix, development and

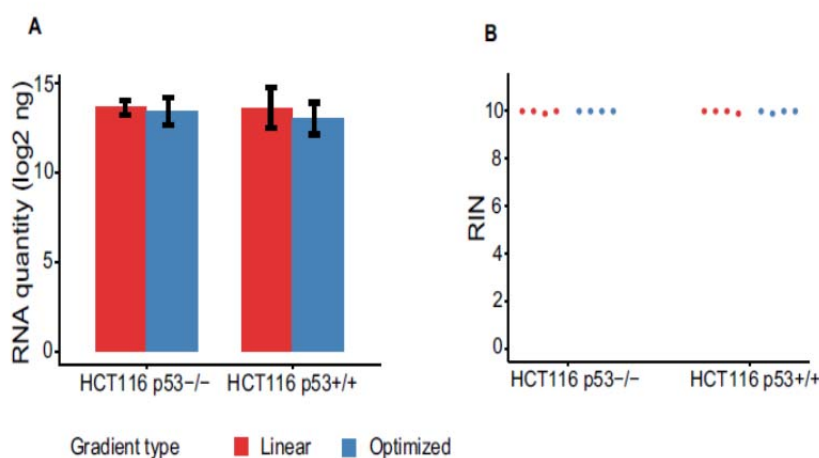


Figure 3. Assessing the quality and quantity of RNA isolated with linear or optimized non-linear gradients. (A) Mean (error bars correspond to standard deviations) amount of RNA (log₂ ng) from quadruplicate experiments using linear or optimized non-linear gradients for both HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} cells (the cytosolic lysate obtained from three 15 cm plates of 80% confluent cells was applied to each gradient). (B) Obtained RNA integrity numbers (RIN) for samples processed using linear and optimized non-linear gradients (same experiment as A).

migration. Moreover, genes whose cytosolic mRNA levels were buffered at the level of translation were enriched for neural related functions (Figure 5D; Supplementary Table S2). Thus, there appears to be selectivity with regards to which cellular functions are targeted by which gene expression mechanism (Figure 5D).

Polysome-profiling of bio-banked breast cancer tissues using optimized non-linear gradients and smartSeq2

To comprehensively evaluate the non-linear sucrose gradient for isolation of efficiently translated mRNA from biobanked tissue samples, we identified a cohort of 161 breast cancer tissues and applied the optimized non-linear gradient to isolate their efficiently translated mRNA. The sizes of the tissue samples were not recorded in the biobank but estimated to vary between <30 to ~100 mg. We could consistently identify the 0 and +1 fractions in the profiles obtained from the non-linear gradient (Supplementary Figure S3). These fractions were pooled and split into one assay- and one backup-sample. The assay-sample was then subjected to RNA extraction and the quality of the isolated cytosolic and polysome-associated RNA was assessed. There was a correlation between the RINs of the two RNA pools (Pearson correlation = 0.66, Figure 6A). RINs for efficiently translated mRNA were higher (i.e. indicating more intact RNA) as compared to those observed in cytosolic input samples (Figure 6B). This shows that a low RIN for the pool of efficiently translated RNA is not caused by the isolation technique, but rather by lower initial RNA quality in those tissue samples. Many of these samples generated very low RNA amounts (<1 ng/μl and <10 ng in total) and hence application of protocols adopted for single cell sequencing would be essential to generate translomes. Indeed, application of Smart-seq2 to a subset of these samples generated RNAseq libraries amendable for RNAseq (Sup-

plementary Figure S3). To ensure that these libraries indeed are of sufficient quality to comprehensively quantify translomes we performed RNA sequencing of efficiently translated and cytosolic RNA from the set of five breast cancer tissues from Supplementary Figure S3 (Supplementary Figure S4). This revealed high technical quality of the resulting sequencing data (Figure 6C). Moreover, we obtained high coverage of the breast cancer translomes as judged by that mRNAs from >12 000 genes showed an RPKM >0.2 (which represent a lower limit of detection (32)) and >10 000 genes had an RPKM >1 (Figure 6D). Thus, combining the optimized non-linear gradient with single cell RNAseq protocols allows for comprehensive exploration of translomes in small tissue samples from biobanks.

DISCUSSION

Many studies show that translational control can have dramatic effects on the proteome (22). This mode of regulation is prevalent following e.g. various stresses and modulation of key cellular pathways such as the mTOR pathway (18). Given the pivotal role of cell signaling and stress in human diseases, the translome is expected to be modulated under a range of pathological conditions. Yet, translomes are vastly understudied as compared to transcriptomes. This includes human tumors where such data are, to our knowledge, lacking (18). This likely reflects that while genome wide approaches for measurements of transcriptomes are relatively easy to apply, methods for studying translomes have not scaled well to larger sample collections. Although polysome-profiling is the preferred method for studies of changes in translational efficiency as compared to ribosome-profiling when the precise location of ribosomes is of lesser importance (19), both these techniques are highly laborious and therefore challenging to apply in large studies. Here, we focused on one aspect of polysome-

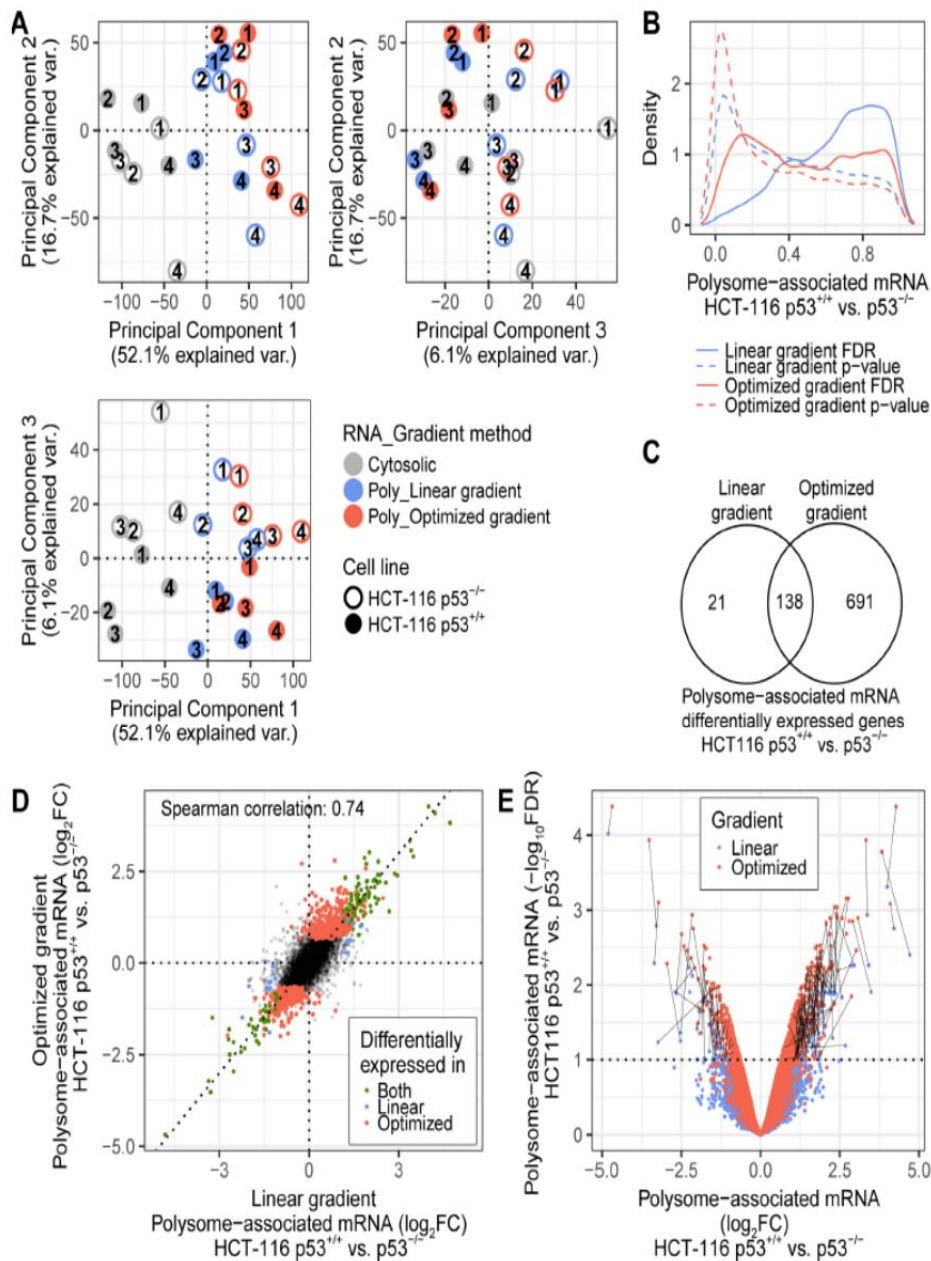


Figure 4. Linear and optimized non-linear gradients produce similar data on translomes. (A) A projection of all samples in the three first components of the principal component analysis. Replicate numbers are indicated within circles. (B) For both gradient methods, an analysis of differential polysome-associated mRNA levels between HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} cell lines was performed. Shown are density plots of p-values (dashed lines) and false discovery rates (plain lines) for both gradient methods. (C) Venn diagram showing the overlap of genes identified using both gradient methods (mRNAs with an FDR < 0.1 were considered differentially associated with polysomes). (D) Scatter plot showing log₂ fold changes using data from the optimized non-linear gradient vs. the linear gradient. Colors correspond to genes differentially polysome-associated and identified by both gradient methods (green); the linear gradient only (blue); the optimized non-linear gradient only (red); or none of the methods (black). (E) Volcano plot for each gradient method (linear gradient in blue, optimized non-linear gradient in red). For genes considered significant by both methods, black lines join the data per mRNA. Poly = Polysome-associated mRNA; FDR = False Discovery Rate; FC = Fold Change

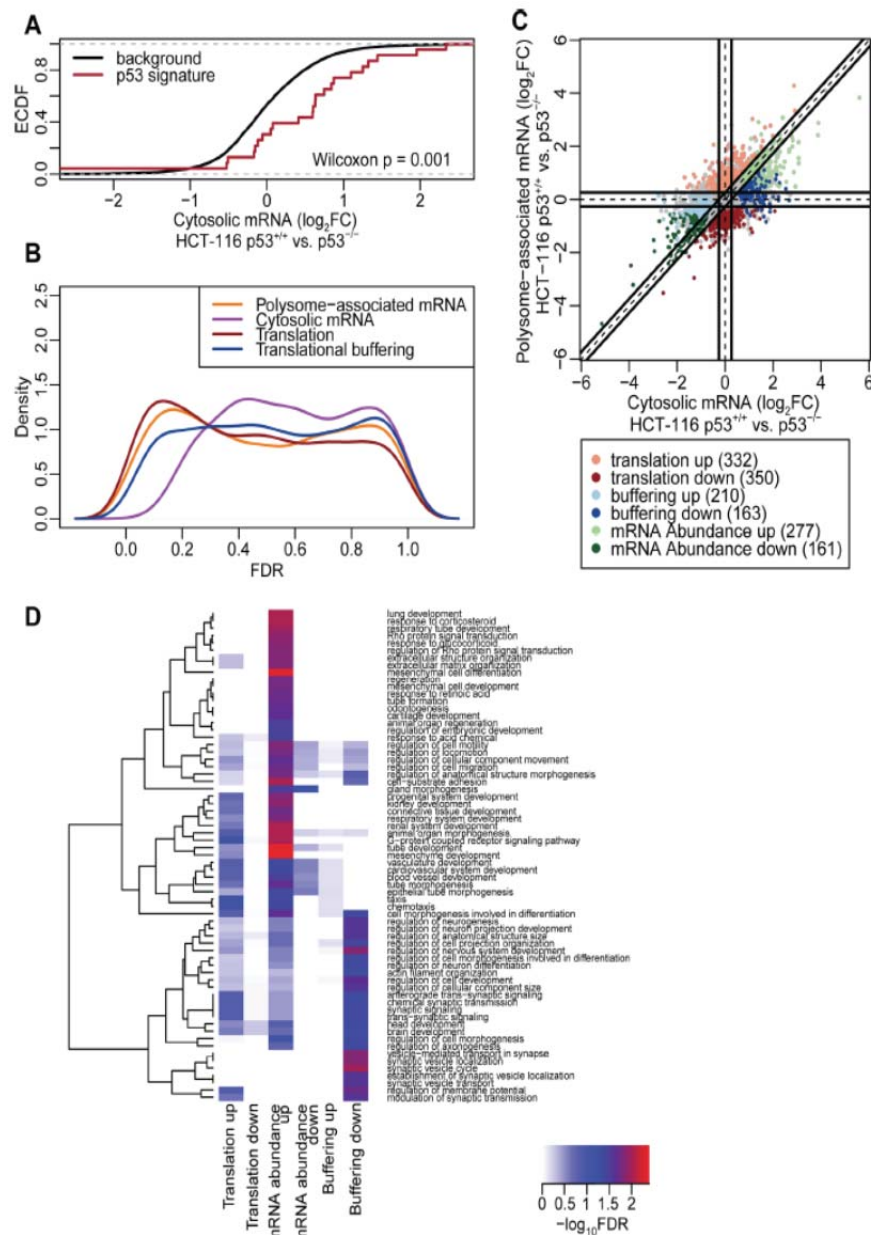


Figure 5. Analysis of the p53 translome of HCT-116 cells using an optimized non-linear gradient. (A) Cumulative distributions of fold-changes for cytosolic mRNA between HCT-116 p53^{+/+} and HCT-116 p53^{-/-} cells for all genes (background) and a set of genes described as transcriptionally induced by p53. (B) Densities of FDRs for analysis of polysome-associated mRNA, cytosolic mRNA and changes in translational efficiency affecting protein levels or buffering (HCT-116 p53^{+/+} versus HCT-116 p53^{-/-} cells). (C) Scatter plot of polysome-associated mRNA \log_2 fold changes versus cytosolic mRNA \log_2 fold changes. Regulated are indicated. (D) Heatmap showing GO term enrichment among genes regulated via abundance (i.e. congruent changes in cytosolic and polysome-associated mRNA) or genes whose translational efficiency affects protein levels or buffering. $-\log_{10}$ FDR of the hypergeometric tests are colour-coded in the heatmap and an unsupervised clustering was applied to GO terms. FDR = False Discovery Rate; FC = Fold Change.

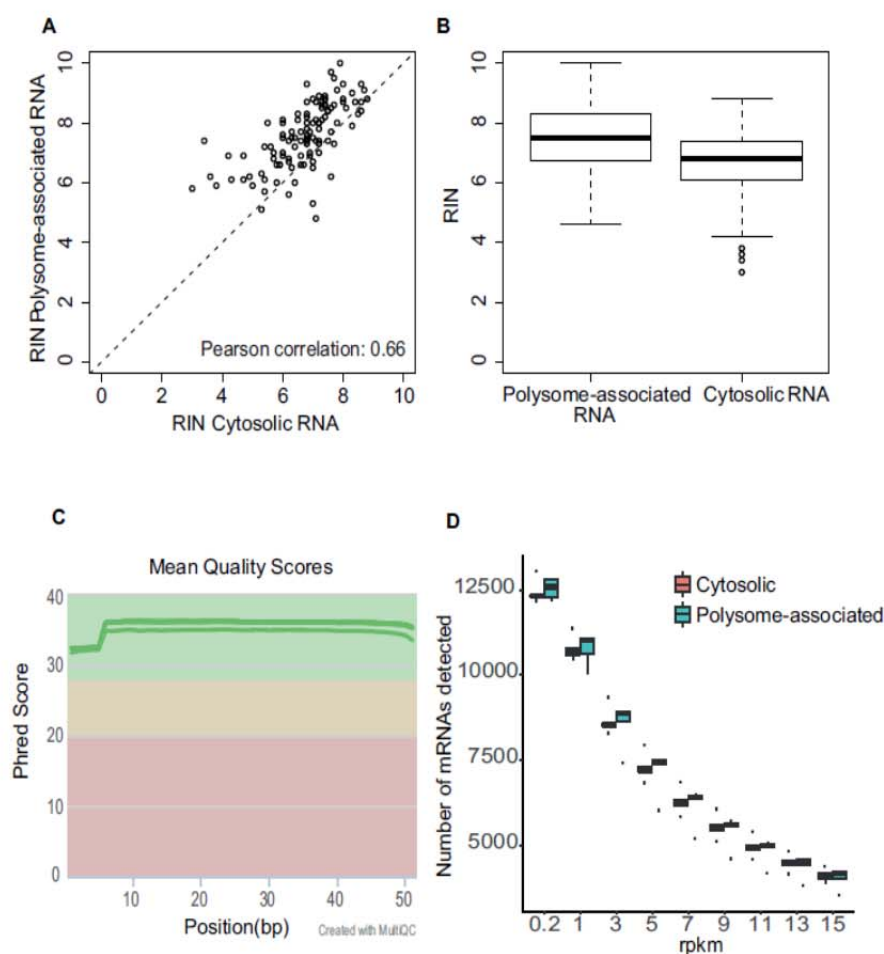


Figure 6. The optimized non-linear gradients isolates efficiently translated mRNA from biobank tissues with an RNA integrity reflecting the starting material sufficient for generation of high coverage translomes. (A) Scatter plot of RIN obtained from polysome-associated mRNA (using the optimized non-linear gradient) and the corresponding cytosolic mRNA. (B) Boxplot of RIN for polysome-associated and cytosolic mRNA (same samples as in (A)). (C) Phred scores across the length of the RNAseq read for sequencing libraries obtained using efficiently translated and cytosolic mRNA from 5 breast cancer tissues (i.e. same as Supplementary Figure S3) as input material for smartSeq2. (D) Boxplots of numbers of genes whose transcribed mRNAs are detected at different RPKM thresholds among cytosolic mRNA ($N = 5$) and efficiently translated mRNA ($N = 5$) isolated from breast cancer samples (i.e. same as Supplementary Figure S3).

profiling which makes it inconvenient, namely that the pool of efficiently translated RNA is obtained in a large volume distributed across multiple fractions that need to be collected and pooled (28). When studying translomes in small tissue samples or primary cells (39,40), this poses a major limitation by leading to extensive dilution of the efficiently translated mRNA, which may cause sample loss and technical variability that may undermine reproducible quantification of the translome. We addressed these issues by introducing an optimized non-linear sucrose gradient, which allows for consistent isolation of efficiently translated

mRNA associated with >3 ribosomes in only one or two fractions. The ability to isolate efficiently translated mRNA enriched for mRNA associated with >3 ribosomes is important to capture shifts in translational efficiency that are largely contained within polysomes. Changes in translation of such genes will be more difficult to detect using e.g. pull-down or pelleting approaches, as association with one ribosome is sufficient for isolation of such RNA. As a result, those approaches will likely be biased towards identification of mRNAs showing on-off regulation. By applying these approaches we assessed the effect of p53 status

under cellular stress induced by serum starvation. It is important to consider that although the cells we used differ in p53 status they likely exhibit additional genetic and epigenetic differences accumulated during their *in vitro* culturing. As a result, the changes in gene expression that we observe may not be directly linked to p53. Nevertheless, consistent with previous literature, we identify a prominent role for changes in translational efficiency affecting protein levels depending on p53 status/activity (41–43). In addition, we highlight translational buffering as a prevalent mechanism that will further decouple mRNA levels from protein levels. Although translational buffering was initially identified in yeast (44–46), it has been observed in a limited set of mammalian models (10,47). This raises the possibility that translational buffering is an overlooked mode of regulation that the cell can utilize to maintain protein levels constant despite fluctuations in mRNA levels. Such a role of post-transcriptional control of gene expression was previously suggested from studies showing that protein levels are more consistent across species as compared to mRNA levels (48,49). Thus, translational buffering may be one underlying factor for this observation, yet the mechanisms and scope of translational buffering remain obscure.

We also introduced single-cell sequencing protocols for quantification of efficiently translated mRNA, as the amounts of purified RNA can be scarce. Similar to when obtaining translomes from limited numbers of primary cells (40), this is essential to allow for studies of translomes using biobank tissue samples as the amount of RNA isolated from such samples appears to be insufficient for standard RNAseq protocols. Although the presented approach alleviates some of the issues with polysome-profiling it does not circumvent the need of sucrose gradients which is still a limiting factor when planning large studies of translomes. Nevertheless, this approach made it possible for us to process >150 tissue samples. Thus, polysome-profiling can now be applied to collections of small tissue samples or primary cells.

AVAILABILITY

The dataset has been deposited at the gene expression omnibus (GSE99909).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge support from Science for Life Laboratory, the Knut and Alice Wallenberg Foundation, the National Genomics Infrastructure funded by the Swedish Research Council, and Uppsala Multidisciplinary Center for Advanced Computational Science for assistance with massively parallel sequencing and access to the UPPMAX computational infrastructure. We acknowledge the A.C. Camargo Cancer Center Biobank for the support in the storage and evaluation of human samples.

FUNDING

Swedish Research Council; Swedish Childhood Cancer Foundation; Swedish Cancer Society; Cancer Society in Stockholm; Wallenberg Academy Fellows Program; STRATCAN (to O.L.); Swedish Childhood Cancer Foundation (to L.M.); STINT to initiate international collaboration (to O.L. and G.H.); FAPESP [2014/15550-9 to GNMH, 2013/03315-2 to FCSL, 2014/04513-5 to HMB, 2015/15451-3 to MR]. Funding for open access charge: Swedish Research Council.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Bava, F.A., Elisovich, C., Ferreira, P.G., Minana, B., Ben-Dov, C., Guigo, R., Valcarcel, J. and Mendez, R. (2013) CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation. *Nature*, **495**, 121–125.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L. and Sonenberg, N. (1996) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1065–1070.
- Holt, C.E. and Schuman, E.M. (2013) The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron*, **80**, 648–657.
- Lindstein, T., June, C.H., Ledbetter, J.A., Stella, G. and Thompson, C.B. (1989) Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science*, **244**, 339–343.
- Deschènes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N. and Ferbeyre, G. (2014) Cellular senescence and protein degradation: Breaking down cancer. *Cell Cycle*, **13**, 1840–1858.
- Roux, P.P. and Topisirovic, I. (2012) Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a012252.
- Morita, M., Gravel, S.P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J. and Topisirovic, I. (2015) mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell cycle*, **14**, 473–480.
- Kristensen, A.R., Gspomer, J. and Foster, L.J. (2013) Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation. *Mol. Syst. Biol.*, **9**, 689.
- Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, **473**, 337–342.
- Jovanovic, M., Rooney, M.S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., Rodriguez, E.H., Fields, A.P., Schwartz, S., Raychowdhury, R. et al. (2015) Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science*, **347**, 1259038.
- Liu, Y., Beyer, A. and Aebersold, R. (2016) On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, **165**, 535–550.
- Parker, M.W., Rossi, D., Peterson, M., Smith, K., Sikstrom, K., White, E.S., Connett, J.E., Henke, C.A., Larsson, O. and Bitterman, P.B. (2014) Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J. Clin. Invest.*, **124**, 1622–1635.
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J. and Topisirovic, I. (2015) Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **14**, 261–278.
- Roffe, M., Beraldo, F.H., Bester, R., Nunziante, M., Bach, C., Mancini, G., Gilch, S., Vorberg, I., Castilho, B.A., Martins, V.R. et al. (2010) Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 13147–13152.
- Ma, T., Trinh, M.A., Wexler, A.J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D.R. and Klann, E. (2013) Suppression of eIF2alpha kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat. Neurosci.*, **16**, 1299–1305.
- Moreno, J.A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J.R., Verity, N., Martin, M.G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C.A. et al. (2012) Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature*, **485**, 507–511.

17. Bellato, H.M. and Hajj, G.N. (2016) Translational control by eIF2alpha in neurons: Beyond the stress response. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, **73**, 551–565.
18. Piccirillo, C.A., Bjur, E., Topisirovic, J., Sonenberg, N. and Larsson, O. (2014) Translational control of immune responses: from transcripts to translatoemes. *Nat. Immunol.*, **15**, 503–511.
19. Gandin, V., Masvidal, L., Hulea, L., Gravel, S.P., Cargnello, M., McLaughlan, S., Cai, Y., Balanathan, P., Morita, M., Rajakumar, A. et al. (2016) nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome Res.*, **26**, 636–648.
20. Hershey, J.W., Sonenberg, N. and Mathews, M.B. (2012) Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011528.
21. Leprivier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A.R., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Somasekharan, S.P. et al. (2013) The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell*, **153**, 1064–1079.
22. Ruggero, D. (2013) Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a012336.
23. Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R. and Weissman, J.S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, **324**, 218–223.
24. Andreev, D.E., O'Connor, P.B., Loughran, G., Dmitriev, S.E., Baranov, P.V. and Shatsky, I.N. (2017) Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 513–526.
25. Ingolia, N.T. (2016) Ribosome footprint profiling of translation throughout the genome. *Cell*, **165**, 22–33.
26. Masvidal, L., Hulea, L., Furic, L., Topisirovic, I. and Larsson, O. (2017) mTOR-sensitive translation: cleared fog reveals more trees. *RNA Biol.*, **1–7**.
27. Andreev, D.E., O'Connor, P.B., Fahey, C., Kenny, E.M., Terenin, I.M., Dmitriev, S.E., Cormican, P., Morris, D.W., Shatsky, I.N. and Baranov, P.V. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *eLife*, **4**, e03971.
28. Gandin, V., Sikstrom, K., Alain, T., Morita, M., McLaughlan, S., Larsson, O. and Topisirovic, I. (2014) Polysome fractionation and analysis of mammalian translatoemes on a genome-wide scale. *J. Visual. Exp.: JoVE*, doi:10.3791/51455.
29. Picelli, S., Faridani, O.R., Bjorklund, A.K., Winberg, G., Sagasser, S. and Sandberg, R. (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.*, **9**, 171–181.
30. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. and Kaller, M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, **32**, 3047–3048.
31. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.
32. Ramskold, D., Wang, E.T., Burge, C.B. and Sandberg, R. (2009) An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput. Biol.*, **5**, e1000598.
33. Robinson, M.D. and Oshlack, A. (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.*, **11**, R25.
34. Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W. and Smyth, G.K. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*, **43**, e47.
35. Wright, G.W. and Simon, R.M. (2003) A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics*, **19**, 2448–2455.
36. Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289–300.
37. Mills, J.R., Malina, A., Lee, T., Di Paola, D., Larsson, O., Miething, C., Grosse, F., Tang, H., Zannis-Hadjopoulos, M., Lowe, S.W. et al. (2013) RNAi screening uncovers Dlx9 as a modifier of ABT-737 resistance in an Emu-myc/Bcl-2 mouse model. *Blood*, **121**, 3402–3412.
38. Gene Ontology Consortium. (2015) Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.*, **43**, D1049–D1056.
39. Bjur, E., Larsson, O., Yurchenko, E., Zheng, L., Gandin, V., Topisirovic, I., Li, S., Wagner, C.R., Sonenberg, N. and Piccirillo, C.A. (2013) Distinct translational control in CD4+ T cell subsets. *PLoS Genet.*, **9**, e1003494.
40. Mao, Y., van Hoef, V., Zhang, X., Wennerberg, E., Lorent, J., Witt, K., Masvidal, L., Liang, S., Murray, S., Larsson, O. et al. (2016) IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood*, **128**, 1475–1489.
41. Loayza-Puch, F., Drost, J., Rooijers, K., Lopes, R., Elkon, R. and Agami, R. (2013) p53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth. *Genome Biol.*, **14**, R32.
42. Zaccara, S., Tebaldi, T., Pederiva, C., Ciribilli, Y., Bisio, A. and Inga, A. (2014) p53-directed translational control can shape and expand the universe of p53 target genes. *Cell Death Differ.*, **21**, 1522–1534.
43. Marcel, V., Catez, F. and Diaz, J.J. (2015) p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene*, **34**, 5513–5523.
44. McManus, C.J., May, G.E., Spealman, P. and Shteyman, A. (2014) Ribosome profiling reveals post-transcriptional buffering of divergent gene expression in yeast. *Genome Res.*, **24**, 422–430.
45. Artieri, C.G. and Fraser, H.B. (2014) Evolution at two levels of gene expression in yeast. *Genome Res.*, **24**, 411–421.
46. Albert, F.W., Muzzey, D., Weissman, J.S. and Kruglyak, L. (2014) Genetic influences on translation in yeast. *PLoS Genet.*, **10**, e1004692.
47. Cenik, C., Cenik, E.S., Byeon, G.W., Grubert, F., Candille, S.I., Spacek, D., Alsallakh, B., Tilgner, H., Araya, C.L., Tang, H. et al. (2015) Integrative analysis of RNA, translation, and protein levels reveals distinct regulatory variation across humans. *Genome Res.*, **25**, 1610–1621.
48. Laurent, J.M., Vogel, C., Kwon, T., Craig, S.A., Boutz, D.R., Huse, H.K., Nozue, K., Walia, H., Whiteley, M., Ronald, P.C. et al. (2010) Protein abundances are more conserved than mRNA abundances across diverse taxa. *Proteomics*, **10**, 4209–4212.
49. Schrimpf, S.P., Weiss, M., Reiter, L., Ahrens, C.H., Jovanovic, M., Malmstrom, J., Brunner, E., Mohanty, S., Lercher, M.J., Hunziker, P.E. et al. (2009) Comparative functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* proteomes. *PLoS Biol.*, **7**, e48.

3.2 APLICAÇÃO DA TRANSLATÔMICA EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA INVASIVO ORIGINADAS DO BIOBANCO DO A.C.CAMARGO CANCER CENTER

Uma vez que a técnica utilizando um gradiente de sacarose não linear foi bem estabelecida, a técnica foi aplicada a uma abrangente casuística com amostras de câncer de mama invasivo foi recrutada no BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center. Os resultados referentes a este objetivo são descritos na segunda parte deste capítulo.

Primeiramente, foram coletados todos os dados clínicos, histopatológicos e moleculares de cada amostra selecionada no BioBanco da instituição. Paralelamente, todas as amostras foram processadas para a aplicação na técnica de perfil polissomal, com subsequente extração de RNA. O RNA extraído foi utilizado para a geração de bibliotecas para sequenciamento com a tecnologia Smart-seq2. Esta etapa foi realizada pelo aluno durante um período de estágio em pesquisa no exterior (Processo BEPE FAPESP nº 2015/11245-0) em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Ola Larsson (Karolinska Institutet). Entretanto, após esta etapa, são necessárias diversas análises com técnicas de bioinformática que, em decorrência do tamanho de nossa casuística, tornaram-se extensas e complexas. Por este motivo, esta fase do projeto está sendo realizada pelo colaborador e os resultados de expressão gênica não serão apresentados nesta tese.

3.2.1 Materiais e Métodos

3.2.1.1 Amostra

Foram incluídos 306 casos, nos quais as pacientes (somente do sexo feminino) tenham sido diagnosticados com carcinoma ductal ou lobular da mama entre os anos de 2000 a 2014, sem tratamento prévio (neoadjuvância), que possuam prontuários eletrônicos disponíveis e cuja amostra esteja presente no BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center. Além disso, somente foram utilizadas amostras com, no mínimo, 90% de representatividade tumoral invasiva analisada pelo patologista responsável do BioBanco da instituição (Dr. Antônio Hugo José Froes Marques Campos).

Foram excluídas amostras de pacientes com presença de metástase no momento do diagnóstico, casos em que as pacientes possuíam outros tumores concomitantes, ou pacientes com idade inferior a 35 anos.

3.2.1.2 Perfil Polissomal (Preparação das amostras, lise e fracionamento do mRNA polissomal)

Metodologia aplicada nos experimentos deste capítulo conforme descrito previamente na publicação apresentada no Capítulo 1 desta tese (LIANG et al. 2018).

3.2.2 Resultados e discussão deste objetivo

Para este objetivo foram selecionadas um total de 306 amostras de carcinoma mamário do tipo invasivo entre os anos de 2010 e 2014. Nestas amostras foi realizado o fracionamento de polissomos e purificação do mRNA total e polissomal conforme descrito na publicação descrita no Capítulo 1 desta tese. Entretanto, a etapa

de isolamento de RNA total e polissomal apresentou degradação do material em aproximadamente com 35% das amostras. Portanto, neste momento 194 amostras encontram-se em fase de análises por bioinformática no laboratório do colaborador (Dr. Ola Larsson – Karolinska Institutet) e todas as tabelas descritivas que serão comentadas a seguir são relacionadas a esta casuística, ou seja, com $n = 194$.

3.2.2.1 Panorama demográfico, histopatológico e molecular das amostras

Após a seleção dos casos incluídos no estudo, foi realizada a análise dos prontuários e construção de uma base de dados demográficos, histopatológicos e moleculares. Pelo fato de as análises de bioinformática não terem sido concluídas em tempo hábil para serem incorporadas nesta tese, os dados das pacientes aqui estão apresentados de forma descritiva.

Assim, o banco de dados clínicos aqui descrito conta com 194 amostras. A média de idade ao diagnóstico foi de 56,4 anos e a mediana de 55,5 anos, o que está de acordo com a estimativa para a maior incidência de câncer de mama na população brasileira de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Também, foi observado que a média do IMC (Índice de Massa Corpórea) das pacientes foi de 26,5, sendo que mais de 61,5% das pacientes encontravam-se acima do peso ideal ($IMC > 24,9$). Embora o excesso de gordura corporal já tenha sido correlacionado como fator de risco para o câncer de mama, este dado não é bem estabelecido na literatura, podendo sofrer alterações dependendo da heterogeneidade populacional de cada casuística, hábitos alimentares de cada país, entre outras variáveis confundidoras para este tipo de interpretação (MCPHERSON et al. 2000). Estes dados são ilustrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Características demográficas.

Características demográficas		
	Variável	n (%)
Sexo	Masculino	0 (0,0)
	Feminino	194 (100)
Média de idade (anos)	56,4	191 (98,4)
Mediana de idade (anos)	55,5	191 (98,4)
IMC	Abaixo do peso, IMC < 18,5	4 (2,5)
	Peso ideal, IMC > 18,5 e < 24,9	58 (36,0)
	Acima do peso, IMC > 24,9	99 (61,5)
Média do IMC	26,5	161 (82,9)
Mediana do IMC	26	161 (82,9)

1 – Índice de Massa Corporal (massa/altura²)

Tendo em vista o tipo histopatológico, do total de 194 amostras tumorais, 161 (84,3%) foram classificadas como Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) e 30 (15,7%) como Carcinoma Lobular Invasivo (CLI), o que é condizente com as proporções encontradas na literatura (LAKHANI et al. 2012; ARPS et al. 2013). Já a graduação histológica é baseada no método de SBR (Scarff-Blom e Richardson) modificado (ELSTON e ELLIS 1991), que se baseia na avaliação da formação de túbulos e glândulas, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. A classificação se dá em graus I a III, que vão de tumores bem diferenciados a pouco diferenciados, respectivamente. Neste quesito, a casuística deste objetivo foi distribuída em 13,1% para grau histológico I, 48,6% do tipo II e 38,3% do tipo III. Acreditamos que a baixa representatividade dos tumores de grau histológico I em nossa casuística se deva a um viés, causado pela pouca disponibilidade de material desses tumores para envio ao BioBanco, por se tratarem em geral de tumores pequenos.

O estadiamento clínico foi baseado no sistema TNM (ZANETTI et al 2017).

Em nossa casuística aproximadamente 43,8% dos pacientes foram estadiadas como T1 e 44,9% como T2 (SMITH et al. 2015), como esperado pelo aumento da detecção de tumores em estádios iniciais. Adicionalmente, 52,5% das pacientes não possuíam qualquer comprometimento linfonodal e 47,5% das pacientes apresentaram classificação N1, N2 ou N3.

Foi observado que aproximadamente 9,1% das pacientes foram a óbito em decorrência do tumor até novembro de 2017. Também, a distribuição das pacientes em período pré (44,8%) e pós (55,2%) menopausa encontra-se bastante equilibrada. Por último, aproximadamente 22% das pacientes desta casuística não tinham engravidado até o momento do diagnóstico. Todas estas informações encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas.

Clínico-patológicas		
Variável		n (%)
Gravidez	Nenhuma	31 (15,9)
	Pelo menos 1	108 (55,7)
	Sem informação	55 (28,4)
	Total	194
Menopausa	Pré	82 (42,3)
	Pós	101 (52,0)
	Sem informação	11 (5,7)
	Total	194
Histologia	CDI ¹	161 (82,9)
	CLI ²	30 (15,5)
	Sem informação	3 (1,6)
	Total	194
Grau histológico	I	24 (12,4)
	II	89 (45,9)
	III	70 (36,1)
	Sem informação	11 (5,6)
	Total	194
Grau nuclear	1	6 (3,1)
	2	51 (26,3)
	3	135 (69,6)
	Sem informação	2 (1,0)
	Total	194
Metástase	Ausente	97 (50,0)
	Linfonodo	75 (38,6)
	Osso	7 (3,6)
	Pulmão	8 (4,1)
	Outros	2 (1,0)
	Sem informação	5 (2,7)
	Total	194
Estadiamento		
T	1	78 (40,2)
	2	80 (41,2)
	3	20 (10,3)
	Sem informação	16 (8,3)
	Total	194
N	0	94 (48,4)
	1	64 (32,9)
	2	21 (10,8)
	Sem informação	15 (7,9)
	Total	194
M	0	194 (100)
	1	0 (0,0)
	Sem informação	0 (0,0)
	Total	194

1 – Carcinoma Ductal Invasivo; 2 – Carcinoma Lobular Invasivo.

Além de dados clínicos, também foram analisados aspectos moleculares utilizados para a classificação e tratamento atuais. A expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais no carcinoma ductal e lobular da mama é um marcador molecular estabelecido como indicativo de bom prognóstico, com menores índices proliferativos e possibilidade de terapia endócrina. (HARRIS et al. 2007; HAMMOND et al. 2010). Interessantemente, é descrito na literatura que a expressão de RE e RP é inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular e por isso alta expressão é associada a prognóstico melhor e tumores menos agressivos com índice proliferativo reduzido. Por este fato, no 14º Consenso de St. Gallen foi estabelecido que tumores luminais com expressão de RP abaixo de 20% podem ser considerados Luminal do tipo B.

No panorama molecular traçado, representado na **Tabela 3**, é possível observar que a maioria das pacientes apresente expressão positiva para os receptores hormonais. Por isso, foi observado que em nossa amostra, aproximadamente 71% das amostras são do tipo Luminal. A diferenciação entre luminal A e B, atualmente, é feita através da avaliação imuno-histoquímica da expressão do marcador Ki67. Porém, no período de 2000 a 2014 (correspondente ao período das amostras desta casuística) esta determinação nem sempre foi prática da rotina diagnóstica e os tumores eram somente classificados como luminais, assim, as amostras também foram classificadas desta maneira. Caso seja necessário, após o sequenciamento, a expressão do marcador Ki67 pode ser determinada futuramente. Entretanto, utilizando o critério de expressão em pelo menos 20% das células com o receptor de progesterona, já foi possível classificar 76 amostras como Luminal B. Também é possível observar na casuística deste trabalho que há um total de 41 amostras

classificadas como triplo-negativas e 11 tumores como *HER2* puro, ou seja, sem qualquer expressão de receptores hormonais.

Tabela 3 - Expressão dos principais biomarcadores para câncer de mama determinados por imuno-histoquímica de rotina.

MOLECULAR		
Variável		n (%)
Receptor estrógeno (RE)	Expressa	136 (70,1)
	Não expressa	56 (28,9)
	Sem informação	2 (1,0)
	Total	194
Receptor progesterona (RP)	Expressa	115 (59,3)
	Não expressa	76 (39,2)
	Sem informação	3 (1,5)
	Total	194
<i>HER2</i>	Não amplificado	133 (68,5)
	Amplificado	29 (14,9)
	Sem informação/ Duvidoso	32 (16,6)
	Total	194
p53	Negativo	58 (29,9)
	Positivo	103 (53,1)
	Sem informação	33 (17,0)
	Total	194
Classificação molecular	Luminal	52 (26,8)
	Luminal A	11 (5,7)
	Luminal B	76 (39,2)
	HER2	11 (5,7)
	Triplo-Negativo	41 (21,1)
	Sem informação	3 (1,5)
	Total	194

Adicionalmente, existe uma alta frequência de amostras com Grau Histológico II-III (GH II-III) com expressão imuno-histoquímica positiva para p53. Esta distribuição está descrita na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Distribuição das amostras em Grau Histológico (GH) e positividade para p53 por imuno-histoquímica.

n (%)	p53 negativo	p53 positivo	total
GH I	9 (16,4)	9 (9,9)	18 (12,3)
GH II - III	46 (83,6)	82 (90,1)	128 (87,7)
total	55 (37,7)	91 (62,3)	146 (100)

3.2.2.2 Perfil polissomal com as amostras obtidas do BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center

Após a seleção das amostras requeridas ao BioBanco do A.C.Camargo Cancer Center, foram feitos os perfis polissomais de acordo com metodologia publicada e descrita no primeiro capítulo desta seção. Na **Figura 6**, está ilustrado um perfil polissomal representativo de uma amostra, evidenciando a presença do primeiro pico, que corresponde a uma concentração de monossomos e subunidades ribossomais (40S, 60S e 80S) e outras partículas celulares leves, e de um segundo pico, o qual corresponde ao concentrado de polissomos com >3 ribossomos, ou seja, mRNAs de fato que estão sendo preferencialmente traduzidos. Vale a pena ressaltar que, a metodologia foi reprodutível independente da classificação histológica, do tempo de armazenamento da amostra no BioBanco da instituição e da classificação molecular.

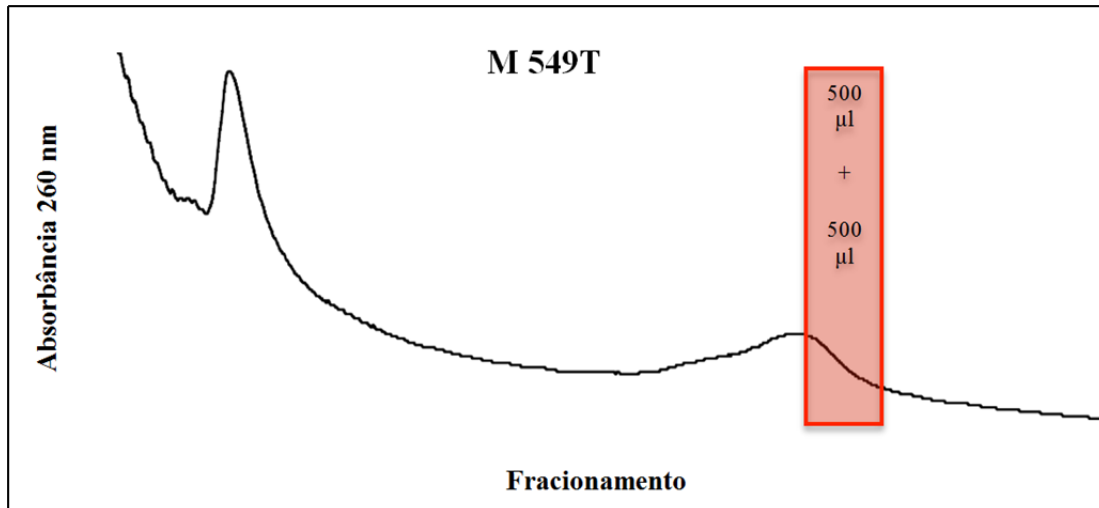


Figura 6 - Perfil polissomal representativo do grupo de amostras selecionadas. Foi utilizado o gradiente denominado “two-step” padronizado e apresentado no primeiro capítulo desta seção. O primeiro pico corresponde ao concentrado de partículas pequenas e sem densidade suficiente para penetrar nas camadas mais densas de sacarose. Principalmente corresponde aos monossomos e subunidades ribossomais (40S, 60S e 80S). O segundo pico corresponde às partículas mais densas que conseguem sedimentar durante o processo de ultracentrifugação, correspondendo, assim, ao concentrado de polissomos com >3 ribossomos (mRNAs preferencialmente traduzidos).

São coletadas duas frações (total de 1 ml), sendo uma das frações a que contém o ponto mais alto do pico correspondente aos polissomos e a fração seguinte (destacado em **vermelho** na **Figura 6**) Assim, espera-se evitar a primeira metade do pico polissomal, que pode estar enriquecido em polissomos mais leves, com mRNAs teoricamente menos comprometidos com a tradução ou que estariam no fim deste processo. A partir deste ponto, o isolamento de RNA (citossólico e polissomal), construção de bibliotecas segundo a metodologia Smart-seq2 e sequenciamento para determinação da expressão gênica em cada amostra foram feitas no laboratório do Dr. Ola Larsson (Karolinska Institutet).

3.2.2.3 Extração de RNA e construção de bibliotecas segundo a metodologia

Smart-seq2

Após a realização do perfil polissomal (fracionamento celular) com as 306 amostras, o RNA total e polissomal de cada uma foi isolado. O material obtido foi quantificado utilizando o kit [®]Qubit RNA HS. Em 11,4% das amostras de RNA citosólico, a concentração final encontrou-se abaixo do limite inferior de detecção do kit. Já nas amostras de RNA polissomal, esta taxa foi de 44,1%. Este cenário é esperado, pois considera-se que a preparação polissomal somente fraciona uma parte do RNA citosólico da célula. Foram plotados os valores das quantificações de RNA total e polissomal obtidos de uma mesma amostra no gráfico abaixo representado pela **Figura 7**. Conforme esperado, foi identificada uma associação entre estas duas variáveis ($R = 0,79$), sugerindo que a amostra inicial (tanto em tamanho quanto em qualidade de armazenamento) é determinante para o processo de extração, ou seja, amostras tumorais muito diminutas propiciam quantidades muito baixas de macromoléculas extraídas. Uma vez que o protocolo de Smart-Seq2 pode ser realizado até mesmo com quantidades extremamente baixas de RNA (até 10 pg, o que corresponde com RNA citosólico de uma célula eucariótica de mamífero), este panorama não foi considerado um problema impeditivo para as próximas etapas.

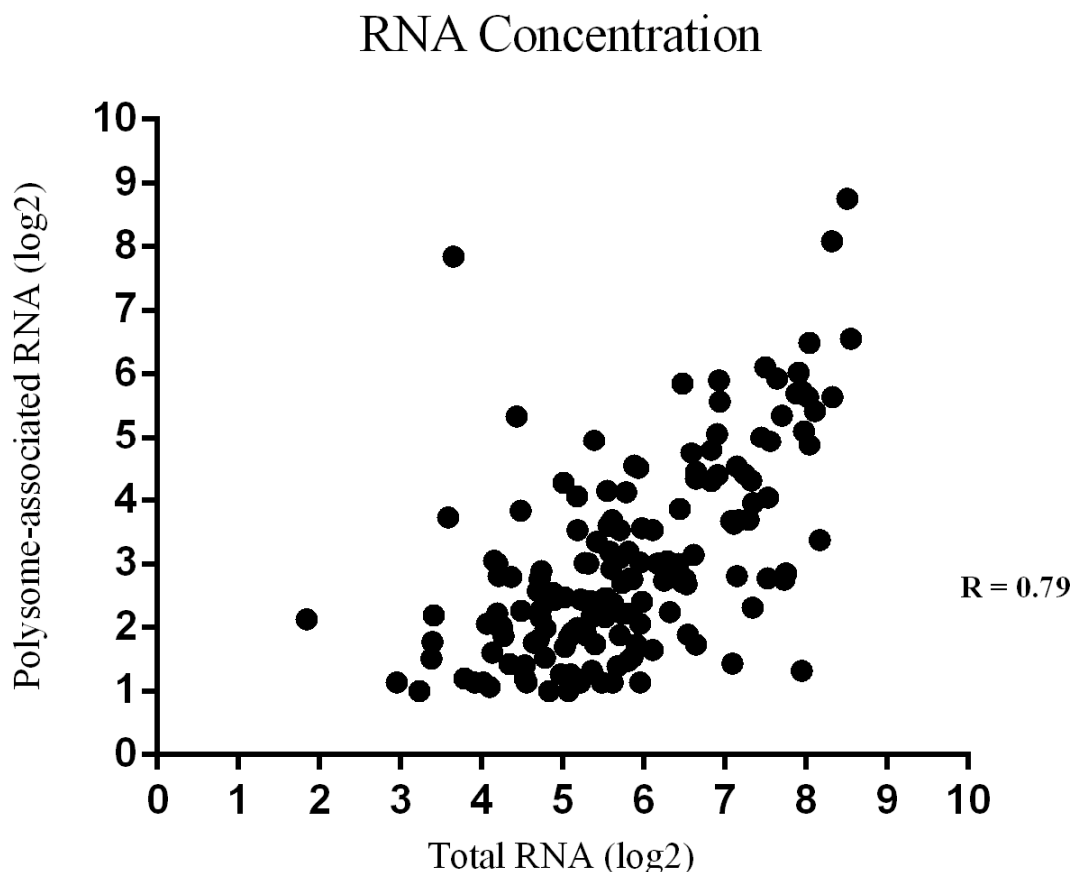


Figura 7 - Gráfico ilustrando a correlação entre as concentrações obtidas de RNA citosólico e polissomal de uma mesma paciente. A correlação (R) foi de 0,79, sugerindo um grande impacto da amostra inicial utilizada na quantidade de RNA obtida durante a extração.

Para avaliar os aspectos qualitativos de material obtido, o equipamento Bioanalyzer 2100 foi utilizado com os chips RNA 6000 Pico da empresa Agilent. Em cada chip é possível realizar micro eletroforese capilar em gel de agarose específico para RNA. O Software do aparelho determina uma variável de qualidade denominada RIN (do inglês – *RNA Integrity Number*), que varia entre 0 e 10, considerado o quão preciso se determina cada pico no perfil eletroforético, a proporção entre 18S e 28S e o *background* da corrida. De uma maneira ideal, somente amostras com RIN superiores a 8 são consideradas de qualidade o suficiente para serem utilizadas para

construção de bibliotecas. Entretanto, uma vez que as amostras utilizadas neste projeto são advindas de armazenamento em BioBanco e são amostras humanas de tecido congelado de longos períodos, certa degradação foi observada. Dessa forma, um *cut-off* com RIN igual ou superior a 5 foi estabelecido para seleção das amostras que seriam convertidas em bibliotecas para sequenciamento. A **Figura 8** ilustra o perfil eletroforético de separação de RNA isolado de algumas amostras representativas. Interessantemente, pode-se observar que ao se sobrepor os perfis originais do RNA polissomal e do RNA citosólico isolado de uma mesma paciente, é possível identificar um padrão de degradação muito semelhante entre ambas as amostras. Isto sugere que o perfil de degradação está mais associado às características intrínsecas da amostra inicial do que em relação a metodologia utilizada para fracionamento e isolamento do RNA. Também, é possível observar um grande pico, somente nas amostras de RNA total, no começo do cromatograma, indicativo do enriquecimento por miRNA, uma vez que a coluna de sílica utilizada no protocolo de purificação permite o resgate de até mesmo RNAs muito pequenos como os miRNA.

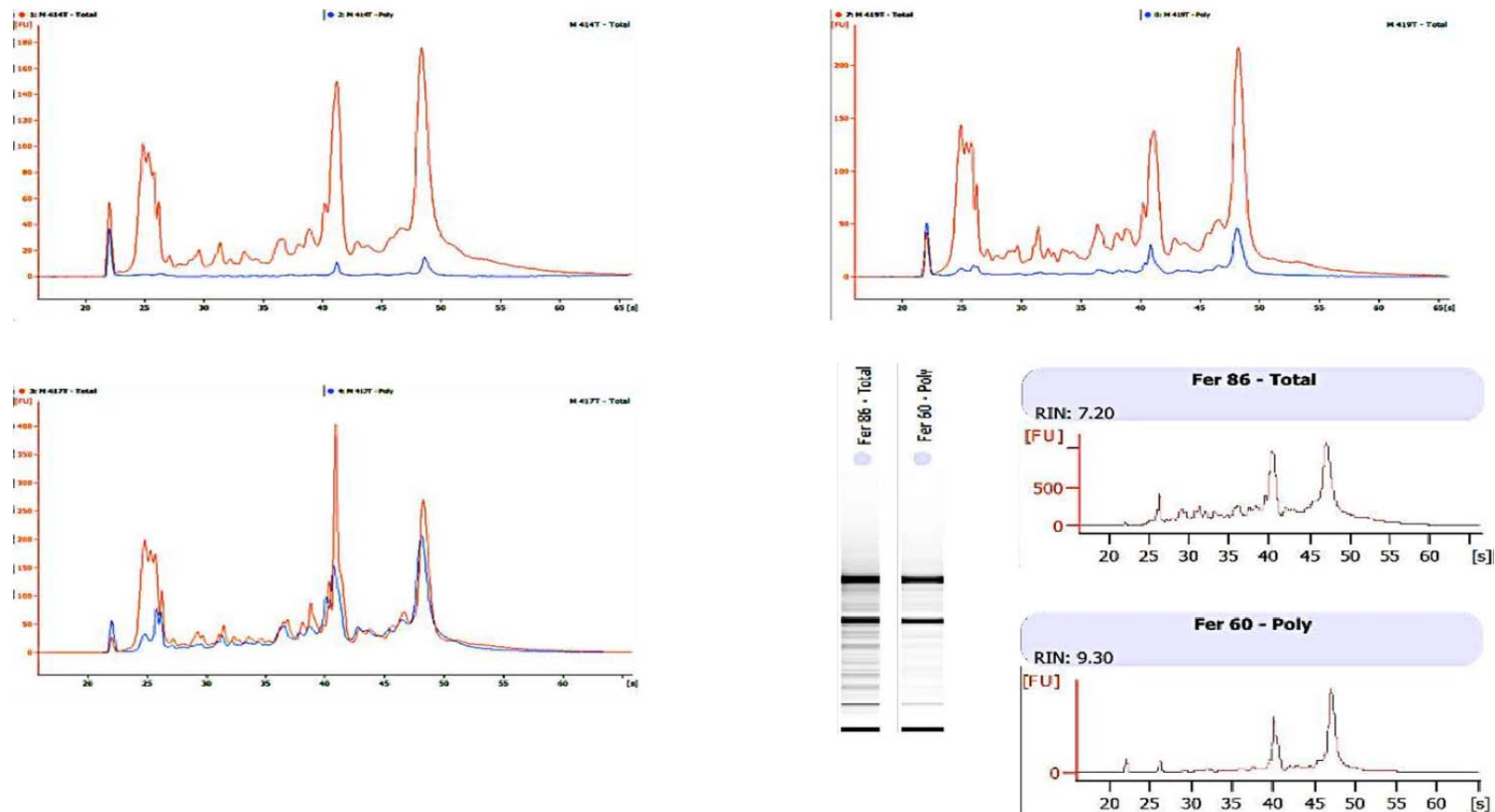


Figura 8 - Dois perfis representativos advindos de amostras de RNA total e polissomal, ilustrando os picos principais dos componentes majoritários de rRNA amplamente utilizados na avaliação qualitativa em extrações de RNA: 18S e 28S. Além disso, também é mostrado a sobreposição de cromatogramas de RNA total e polissomal advindos de uma mesma paciente, revelando o pico correspondente a miRNAs e revelando o perfil de degradação observado para cada amostra (RNA Citosólico – curva vermelha; RNA polissomal – curva azul).

Em uma perspectiva qualitativa, amostras de RNA polissomal apresentam RINs mais altos em relação à amostra de RNA total advindas de uma mesma paciente. Isso se deve ao fato da maquinaria de tradução somente acessar mRNAs íntegros e, assim, durante o fracionamento pela técnica de perfil polissomal grande parte de mRNAs degradados é eliminada. Entretanto, é possível observar uma correlação entre a qualidade (RIN) do RNA total e polissomal isolados de uma mesma amostra ($R = 0,83$), sugerindo novamente que o estado inicial da amostra adquirida do BioBanco da instituição tem grande impacto nos resultados experimentais obtidos. Nenhuma relação foi encontrada entre o RIN alcançado e a classificação molecular (Luminal A, Luminal B, HER ou Triplo Negativo) da amostra. Tais considerações são ilustradas na **Figura 9**. Vale a pena mencionar que foi explorada a relação entre o tempo de armazenamento da amostra e a qualidade das macromoléculas extraídas. Não foi encontrada nenhuma correlação, ou seja, a metodologia é aplicável mesmo em amostras com intervalo maior de armazenamento no BioBanco da instituição (Lupinacci FCS, dados ainda não publicados).

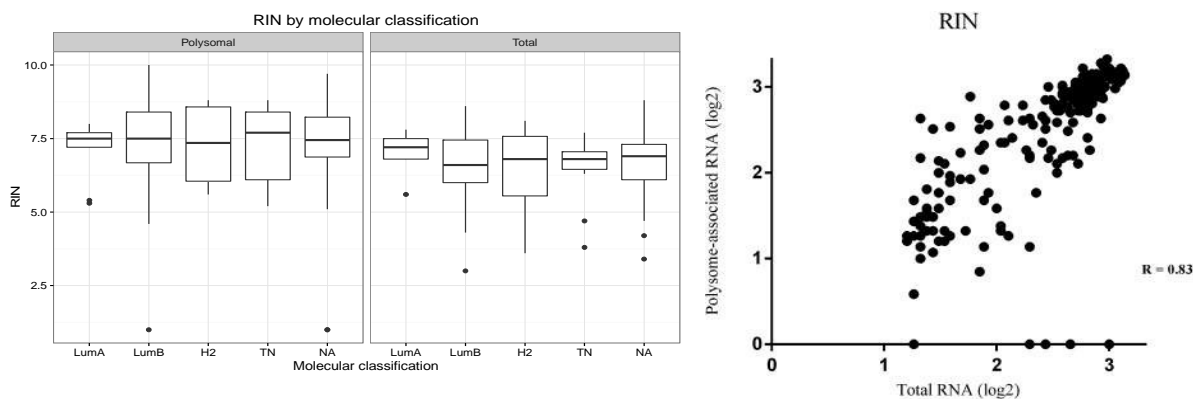


Figura 9 - Relação qualitativa do RNA (RIN) com a fração de origem (total ou polissomal) e subtipo molecular e análise da relação qualitativa entre RNA total e polissomal de uma mesma amostra. No primeiro gráfico é mostrado a associação entre o RIN obtido por amostra de RNA isolada e a classificação molecular de cada paciente. Além disso, no gráfico da esquerda, é possível observar a associação entre o RIN do RNA polissomal e do RNA total advindos de uma mesma paciente, ou seja, sugerindo uma forte associação entre estas duas variáveis e revelando o impacto das características da amostra de tecido inicial nos resultados experimentais obtidos.

Em resumo, 388 amostras (194 pacientes, ou seja, 194 amostras de RNA citosólico + 194 amostras de RNA polissomal) com RIN igual ou superior a 5 foram obtidas após isolamento do RNA de todas as amostras, as quais foram integralmente convertidas em bibliotecas para sequenciamento. Amostras com RIN inferior a 5 foram consideradas degradadas e sem qualidade suficiente para síntese de bibliotecas representativas. Também, até mesmo as amostras com concentrações indetectáveis pelo sistema Qubit de quantificação foram utilizadas para construção de bibliotecas.

É importante mencionar que na casuística existiam 42 amostras de tecido normal pareado, que foram fracionadas e tiveram RNA citosólico e polissomal extraídos. Estes tecidos normais eram caracterizados por tecido adjacente (borda) ao tumor. Entretanto, inesperadamente, somente 4 amostras normais não se encontraram completamente degradadas e, por este motivo, não foram utilizadas na próxima etapa

do projeto. Não foram encontradas justificativas que pudessem sugerir a possível razão pela qual somente as amostras advindas de tecido normal (adjacente do tumor) foram quase 100% degradadas. Foi considerado que no tecido mamário, normalmente o tecido adjacente é tecido adiposo, caracterizado por ser menos celular, o que pode ter contribuído para esse achado.

3.2.2.4 Síntese de bibliotecas por meio da metodologia Smart-seq2

A técnica SmartSeq2 foi desenvolvida por PICELLI et al. (2014a) e permite o sequenciamento de alguns picogramas de RNA, tendo sido especialmente importante para a adaptação da técnica de translatômica para a utilização em amostras de pequeno tamanho.

A transcrição reversa (TR) é dedicada a converter todo RNA utilizado como material de partida para cDNA usando oligo-dT. Com esta estratégia é possível converter somente mRNAs para cDNA, diminuindo a contaminação com outro tipo de material genético. A reação de TR usa a enzima *Moloney murine leukemia* (M-MLV), que adiciona 3 citosinas (C) na porção 3' da nova fita de cDNA. Esta propriedade é levada em consideração para desenhar um *primer* (“locked nucleic acid (LNA)- template switch oligo” - TSO) que contém em sua estrutura 2 riboguanosinas (RNA- rGs) na segunda e terceira posição e uma guanósina modificada quimicamente na primeira posição (PICELLI e colaboradores 2014), promovendo a ligação de forma estável nas 3 citosinas adicionadas durante a RT. Assim, após a conversão dos transcritos para cDNA é adicionado o LNA-TSO para permitir a pré-amplificação do material. Após a transcrição reversa ser finalizada, uma PCR convencional é feita para uma segunda rodada de amplificação do cDNA

obtido. Quando concluídas as duas reações, perfis eletroforéticos são gerados e revelam um enriquecimento grande na região entre 1000-2000 pb, o que corresponde à média de tamanho da maioria dos mRNAs presentes numa célula humana.

Depois da síntese e amplificação do cDNA, é necessário clivar o material obtido em fragmentos menores para permitir o sequenciamento. Então, é realizada uma reação de fragmentação, desenvolvida para que permita uma segunda amplificação do material fragmentado. Para isso se utiliza a transposase Tn5 que é capaz de clivar o DNA de forma aleatória, gerando fragmentos de 300 pb e ao mesmo tempo incorporar elementos transponíveis de sequência conhecida. Quando finalizada a reação de fragmentação, uma segunda PCR é realizada, amplificando todo material obtido. Os *primers* usados nesta PCR hibridizam nos elementos adicionados pela Tn5 em cada fragmento e também possuem em suas estruturas sequências únicas chamadas de índices, as quais permitem o rastreo dos fragmentos e associação com uma amostra inicial específica.

A primeira etapa desta metodologia é sintetizar cDNA a partir do RNA isolado previamente. A transcrição reversa foi feita com todas as 388 amostras selecionadas para esta etapa com sucesso. Todas as reações foram feitas com 2 ng de RNA como quantidade de partida. Em amostras com concentrações indetectáveis, 2 µL da amostra de RNA foram utilizados, uma vez que este é o volume máximo de amostra que pode ser utilizado nesta reação, de acordo com a metodologia padronizada por PICELLI et al. (2014). Após a reação de transcrição reversa, uma reação de PCR é feita para amplificar o material obtido (cDNA) e o número de ciclos é baseado na quantidade, em massa, de material utilizado no início, uma vez que quanto menos material disponível maior a necessidade de se aumentar a quantidade

em ciclos desta reação de PCR. Entretanto, como é sabido que a eficiência em toda reação de PCR é inversamente proporcional ao tamanho do molde, é recomendado manter o número de ciclos no menor valor possível, evitando assim, qualquer viés causado pelo excesso da amplificação, ou seja, um excesso no número de ciclos poderia amplificar preferencialmente uma subpopulação de transcritos maiores. Portanto, 16 ciclos foram usados em todas as reações de PCR feitas após a transcrição reversa. A concentração média obtida com a maioria das amostras foi em torno de 10 ng/ μ L, o que é suficiente para a segunda etapa do protocolo, pois somente 4 ng de cDNA são necessários.

Após esta primeira etapa e a quantificação de cada amostra, uma análise qualitativa foi feita. Para isso, corridas do material em eletroforese capilar utilizando chips de alta sensibilidade para DNA foram aplicados no equipamento BioAnalyzer. No cromatograma, é possível observar uma região enriquecida entre 1000 – 2000 pb, revelando amplificação do cDNA obtido. Este tamanho corresponde com a faixa de tamanho médio da maioria dos mRNAs de uma célula eucariótica humana. Além disso, os perfis eletroforético obtidos de amostras de RNA total e polissomal de uma mesma paciente foram sobrepostos nesta etapa. Com isso, foi possível observar o mesmo padrão no cDNA sintetizado com ambas as amostras advindas de uma mesma paciente, sugerindo que a reação de amplificação estabelecida não apresentou distinção entre o RNA citosólico e o RNA polissomal. Este evento evidencia que os 16 ciclos utilizados não causaram viés de amplificação em decorrência da qualidade do material, pois o RIN associado ao RNA polissomal tende a ser maior em relação ao escore obtido no RNA citosólico. Perfis representativos desta etapa do protocolo, juntamente com as observações discutidas estão ilustrados na **Figura 10**.

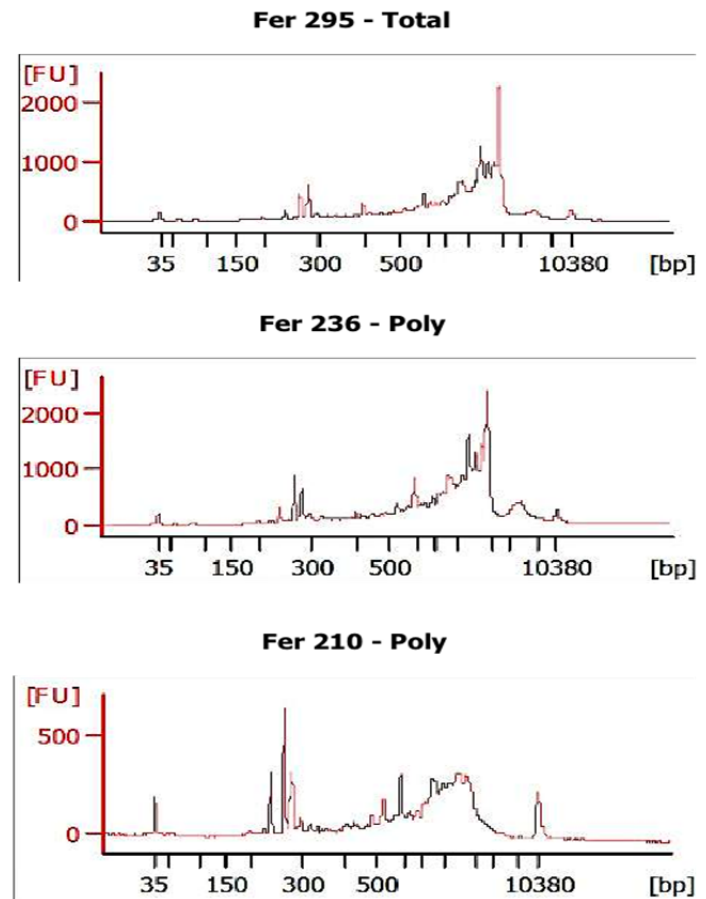
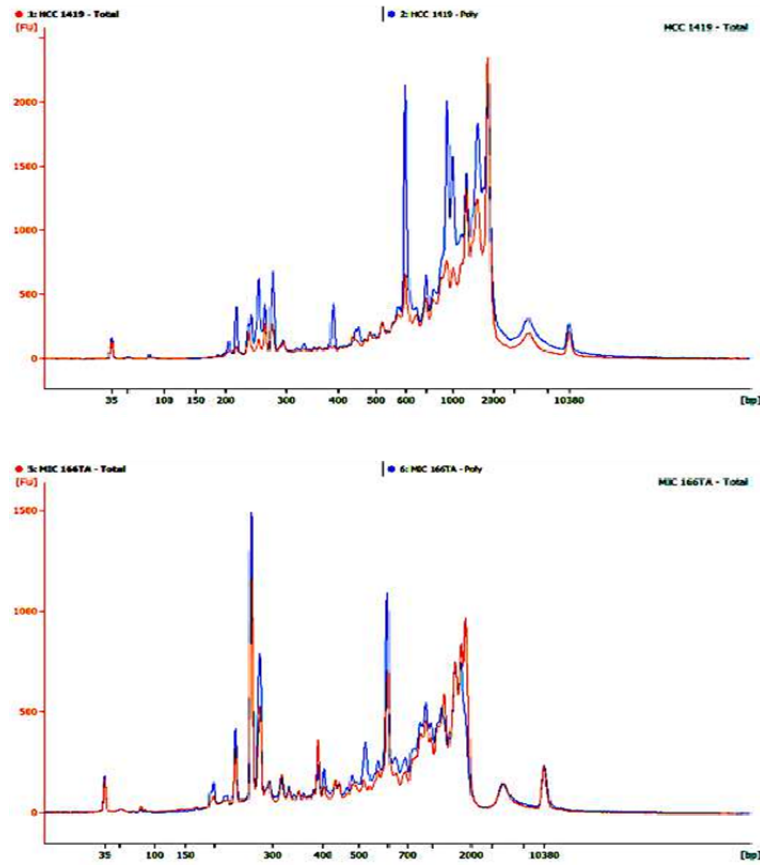


Figura 10 - Cromatogramas do cDNA obtido após reação de transcrição reversa seguida de PCR pré-amplificatória. É possível observar uma região enriquecida de fragmentos em torno de 1000-2000pb nos cromatogramas apresentados. Além disso, é possível perceber que o perfil do cDNA obtido segue o mesmo padrão entre RNAs citosólicos e polissomais advindos de uma mesma paciente, sugerindo que o número de ciclos estabelecidos não está sendo suficiente para uma possível amplificação preferencial (RNA Citosólico – curva vermelha; RNA polissomal – curva azul).

A próxima etapa desta metodologia é a fragmentação do cDNA sintetizado. Conforme descrito anteriormente, para isto uma transposase mutada e hiperativa, denominada Tn5, é utilizada juntamente com fragmentos de DNA específicos. Esta enzima foi sintetizada por Picelli e colaboradores (2014), trabalho no qual os pesquisadores realizam mutações sítio-dirigidas na transposase denominada Tn5 para melhorar o processo de construção de bibliotecas à base de fragmentações (PICELLI et al. 2014b). Os fragmentos inseridos por esta enzima são considerados para síntese dos oligonucleotídeo utilizados na próxima reação de PCR. Após a fragmentação do material, é possível observar uma região enriquecida entre 200-300 pb, pois a enzima cliva o cDNA de forma randômica a cada 250 pb aproximadamente. Esta propriedade permite a utilização da Tn5 sem que ocorra a formação preferencial de alguns fragmentos por algum possível reconhecimento majoritário de algum sítio. A qualificação da eficiência desta reação também é avaliada em eletroforese capilar e perfis representativos estão ilustrados na **Figura 11**.

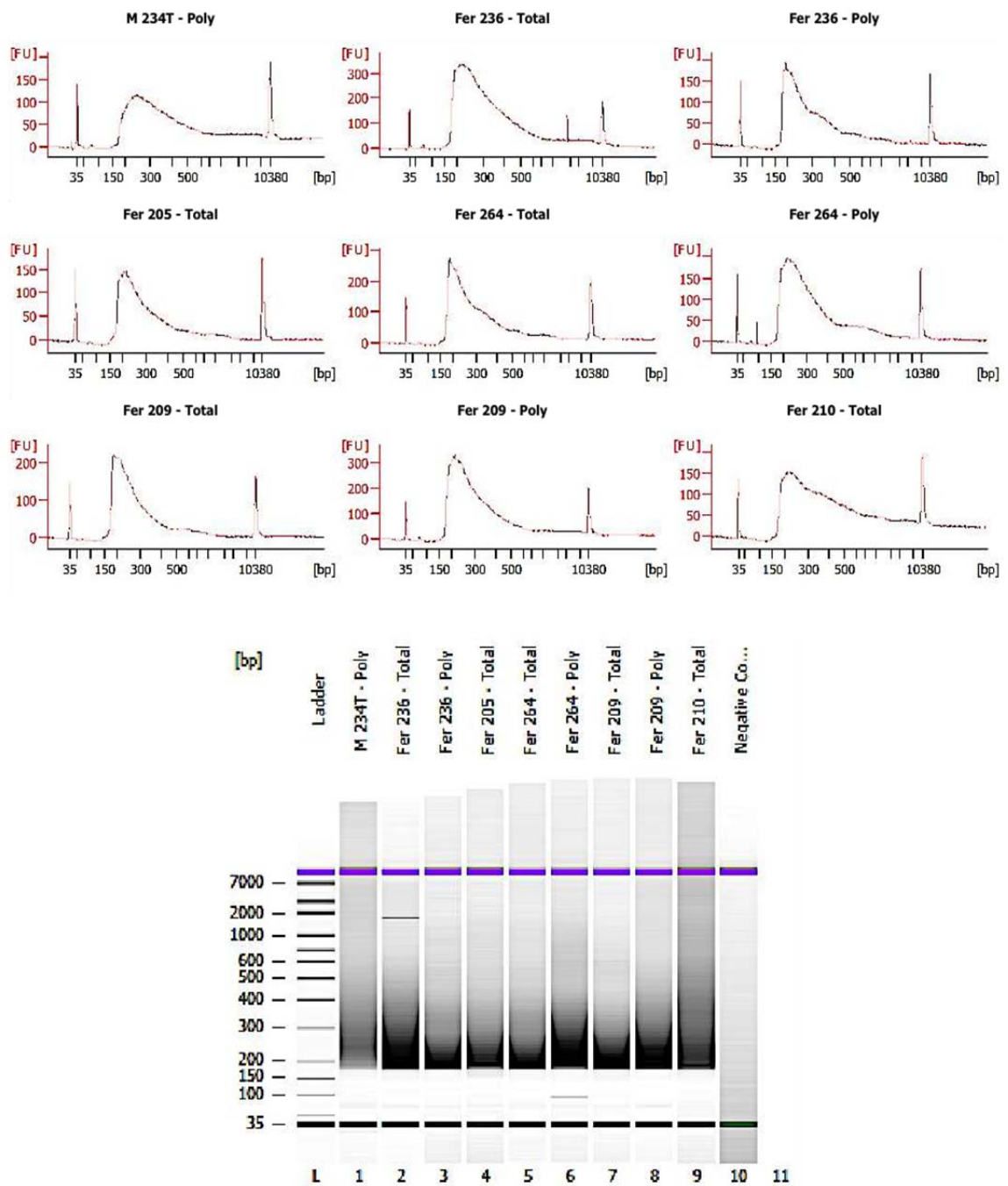


Figura 11 - Perfis representativos de preparações de bibliotecas finais, porém ainda sem a inserção dos *indexes*. A região enriquecida em torno de 200 – 300 bp ilustra uma boa qualidade de biblioteca com a maioria do cDNA em fragmentos pequenos para serem sequenciados de forma eficiente.

Após a reação de fragmentação do cDNA, uma última reação de PCR é feita com *primers* específicos para cada amostra. Cada amostra recebe, de forma aleatória, um par de oligonucleotídeos contendo um conjunto de *indexes*. Cada oligonucleotídeo contém uma sequência capaz de anelar no fragmento inserido pela Tn5, seguido da sequência denominada *index* e, por fim, uma sequência padrão para que os fragmentos hibridizem na plataforma do aparelho de sequenciamento. Estas estruturas contidas nos oligonucleotídeos, denominadas de *indexes*, são ferramentas utilizadas para que, com técnicas de bioinformática, seja possível determinar qual sequência corresponde a qual amostra. Este ponto é importante uma vez que é possível sequenciar até 96 amostras por plataforma do sequenciador. Esta combinação pode ocorrer, pois existem 12 *primers forward* e 8 *primers* do tipo *reverse*, resultando em 96 combinações possíveis. As amostras foram sequenciadas por uma *facility* dentro da Infraestrutura Nacional para Genômica (Estocolmo – Suécia), localizada em conjunto com o Karolinska Institutet.

A molaridade de cada amostra foi calculada levando em consideração o tamanho médio dos fragmentos obtidos e a concentração final de cada biblioteca. Assim, todas as amostras foram diluídas para uma concentração final de 10 nM e misturadas em conjuntos de, no máximo, 96 amostras. Após esta etapa, todo o conteúdo foi sequenciado em plataformas da empresa Illumina.

Importante ressaltar que o artigo científico apresentado no capítulo 1 desta tese apresenta, na Figura 6 do artigo, resultados preliminares com algumas amostras desta casuística de 194 amostras. Estes resultados mostram o controle de qualidade, ilustrando a qualidade da biblioteca sintetizada e, também, demonstram a cobertura gênica comparando o RNA citosólico e polissomal.

Portanto, até este ponto foi possível demonstrar que, de forma inédita, conseguiu-se aplicar o conceito de translatoômica em amostras tumorais humanas advindas de BioBanco. Uma nova metodologia de perfil polissomal foi desenvolvida, assim como todas as adaptações do protocolo Smart-seq2 para este projeto, que, inicialmente, foi desenvolvido para construção de bibliotecas de células únicas. Finalmente, foi possível o sequenciamento, então, do RNA citosólico e polissomal de 194 pacientes com carcinoma mamário invasivo e que foram tratadas no A.C.Camargo Cancer Center. Entretanto, os dados de expressão gênica resultados deste objetivo serão divulgados por meio de publicação científica futuramente. Tais análises tornaram-se extremamente complexas e extensas devido ao alto número de amostras contempladas neste projeto e, por esta razão, não se encontram apresentados nesta tese.

3.2.2.5 Análise das taxas de tradução determinadas por perfil polissomal com informações anatomopatológicas das pacientes desta casuística

Paralelamente à construção das bibliotecas (isolamento do RNA e síntese de material para sequenciamento), a taxa de tradução das amostras foi determinada. Conforme ilustrado na **Figura 6**, todas as amostras foram fracionadas pela técnica de perfil polissomal do tipo *two-step* (LIANG et al. 2018). Com a realização da técnica nas amostras oriundas do Biobanco do AC Camargo Cancer Center, é obtido um cromatograma, no qual é possível observar a presença de dois picos. O primeiro deles corresponde a um acúmulo de monossomos, ou seja, representa a identificação do ribossomo maduro estruturado (80S) e uma fita de mRNA. Esta estrutura celular corresponde aos mRNAs que não estão sendo mais traduzidos ou estão em fase de

término de tradução, ou seja, com baixa expressão proteica. Já o segundo pico corresponde aos polissomos (fitas de mRNAs com mais de um ribossomo ancorado). Um polissomo representa um mRNA altamente traduzido, o que pode ser interpretado como aquela população de mRNAs mais importantes para o fenótipo celular num determinado momento.

Esta ilustração gráfica permite uma quantificação da área sob a curva. Com a utilização de um *software* específico (ImageJ - <https://imagej.nih.gov>), é possível determinar matematicamente, por meio da criação de polígonos, a área que representa os monossomos (baixa taxa de tradução – nesta tese representada pelo termo “mono”) e a área que representa os polissomos (alta taxa de tradução – nesta tese representada pelo termo “poly”). Desta forma, foram quantificados todos os perfis seguindo esta metodologia, ressaltando que o mesmo intervalo foi sempre considerado para quantificar o pico mono e o pico poly em todos os perfis.

Finalmente, a taxa de tradução global das amostras foi estimada pela razão poly/mono. Determinando-se a razão é possível analisar todas as amostras, independentemente de fatores como tamanho da amostra de tecido inicial e quantidade de material de partida para realização do perfil polissomal. Além disso, analisando-se a razão temos que quanto maior o dividendo, ou seja, maior a área dos monossomos em relação aos polissomos, menor a razão obtida, indicando menor taxa de tradução global. Ao mesmo tempo, quanto maior a área dos polissomos em relação aos monossomos, tem-se uma razão maior, o que indica uma maior atividade de tradução nas células tumorais que compunham a amostra.

Após determinada a taxa de tradução para todas as amostras (nesta tese representada pelo termo “poly/mono”), explorou-se a relação entre tradução e

proliferação celular via índice mitótico, o que está ilustrado na **Figura 12**. Foi possível observar que ao plotar-se num gráfico xy a taxa de tradução vs. o índice mitótico de todas as pacientes, duas populações podiam ser isoladas (**painel A**). A melhor separação ocorria quando se analisava a razão entre índice mitótico/taxa de tradução com um cut-off de 8, ou seja, existe um conjunto de pacientes que apresenta aumento de tradução com um leve aumento no índice mitótico (representado em **vermelho** na **Figura 12**) e um outro conjunto de pacientes que apresenta um pequeno aumento na taxa de tradução com expressiva ampliação na contagem de mitoses (representado em **azul**). Considerando-se as equações das retas de tendência destes dois grupos, conforme ilustrado no **painel A** e assumindo uma taxa hipotética de tradução de 1 para ambos, tem-se um índice mitótico de 25 para a população **azul** e 3,7 para a população **vermelha** (aproximadamente 6,7 vezes maior). Este mesmo padrão é observado ao analisar-se os grupos moleculares luminal A, luminal B e triplo negativo, representados pelos **painéis B, C e D**, respectivamente. Importante ressaltar que, pelo pequeno número de amostras classificadas como HER2, este grupo foi excluído das análises.

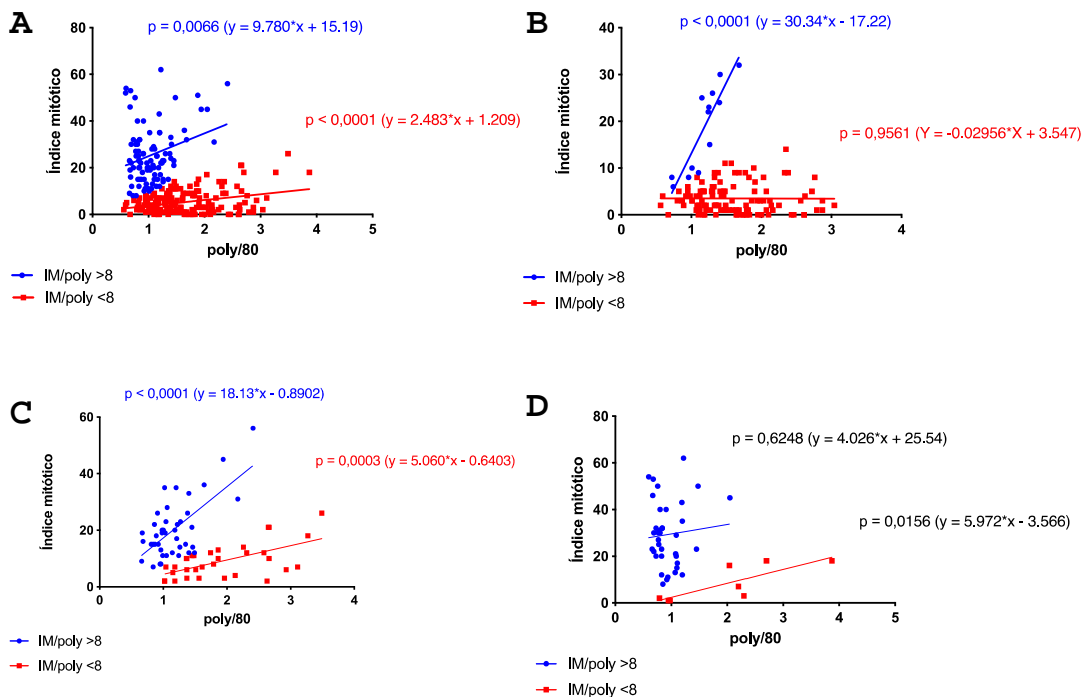


Figura 12 - Análise da taxa de tradução vs. índice mitótico. É possível observar o isolamento de duas populações ao analisar-se a taxa de tradução vs. índice mitótico em gráficos xy. A população em **azul** apresenta elevadas contagens de mitose com pequenos aumentos na taxa de tradução, ao passo que a população **vermelha** apresenta grande aumentos na taxa de tradução com índices mitóticos menores. O **painel A** apresenta uma análise com todas as pacientes, e os **painéis B, C e D** apresentam a mesma análise com os grupos moleculares luminal A, luminal B e triplo negativo respectivamente.

Este achado permite algumas inferências acerca do processo de tradução na célula tumoral. A tradução é um mecanismo altamente onerado do ponto de vista energético para a célula e, por isso, apresenta diversos pontos de regulação, os quais são dirigidos por fatores de tradução (eIFs). Conforme apresentado na introdução desta tese, a tradução global contempla a leitura de mRNAs importantes para todos os processos celulares. Entretanto, existem momentos em que algumas populações específicas de mRNAs engajados em processos celulares direcionados, são mais traduzidas que outras, fenômeno chamado de tradução específica. Um exemplo neste cenário é o fator de tradução eIF4E, que quando superexpresso promove uma maior

taxa de tradução de mRNAs envolvidos com proliferação celular (LARSSON et al. 2007).

Assim, aplicando-se os conceitos de tradução global e tradução específica nas análises apresentadas na **Figura 12** podemos hipotetizar que na população em **vermelho** (com razão baixa entre índice mitótico/tradução) a tradução esteja distribuída de forma global entre todos os processos celulares básicos, assim, quando aumenta a proliferação existe um aumento proporcional nas taxas de tradução global. Estes tumores possivelmente apresentam uma distribuição da efetividade da maquinaria de tradução entre os mRNAs de forma a não privilegiar algum grupo específico, como por exemplo uma excesso na tradução de mRNAs envolvidos com proliferação e crescimento celular.

Já na população em **azul** (alta razão entre índice mitótico/tradução), as células apresentam-se altamente engajadas com a proliferação celular, sem uma igual correspondência de aumento de tradução. Podemos hipotetizar para esta população, que haveria um descontrole traducional, com direcionamento da tradução para mRNAs associados a proliferação celular, um indicativo de tumores de pior prognóstico.

Por este motivo foi analisada a curva de sobrevida livre de progressão e sobrevida global de acordo com a razão índice mitótico/taxa traducional. A **Figura 13** ilustra as curvas de Kaplan-Meier com a sobrevida livre de progressão. O **painel A** desta figura mostra que a população **vermelha** apresenta um prognóstico melhor em relação a população **azul**. Assim, contribuindo com a hipótese proposta, a população que apresenta razões índice mitótico/tradução menores, de fato possui um melhor prognóstico. Além disso, era importante analisar se o inverso também era

verdadeiro, ou seja, se taxas de tradução maiores estariam relacionados com um melhor prognóstico. Esta informação sugere que a tradução global (não comprometida com algum processo celular como proliferação) estaria associada com um melhor prognóstico. Interessantemente, o **painel B** da **Figura 13** mostra que, utilizando-se uma linha de corte de 1,4 para esta variável, é possível observar que as pacientes com taxas de tradução menores apresentam prognósticos piores nas curvas de sobrevida livre de progressão.

Estes resultados permitem, até o momento, a sugestão que o perfil da maquinaria de tradução na célula pode ser um indicativo de prognóstico. Tumores que apresentam altas taxas de tradução sem um aumento direcionado de processos celulares como proliferação, teriam um comportamento menos alterado ao nível traducional, sendo compatível com um melhor prognóstico determinado pela sobrevida livre de progressão. Ao mesmo tempo, tumores mais próximos da tradução específica de populações de mRNAs, teriam um maior descontrole celular, o que estaria associado a um possível pior prognóstico.

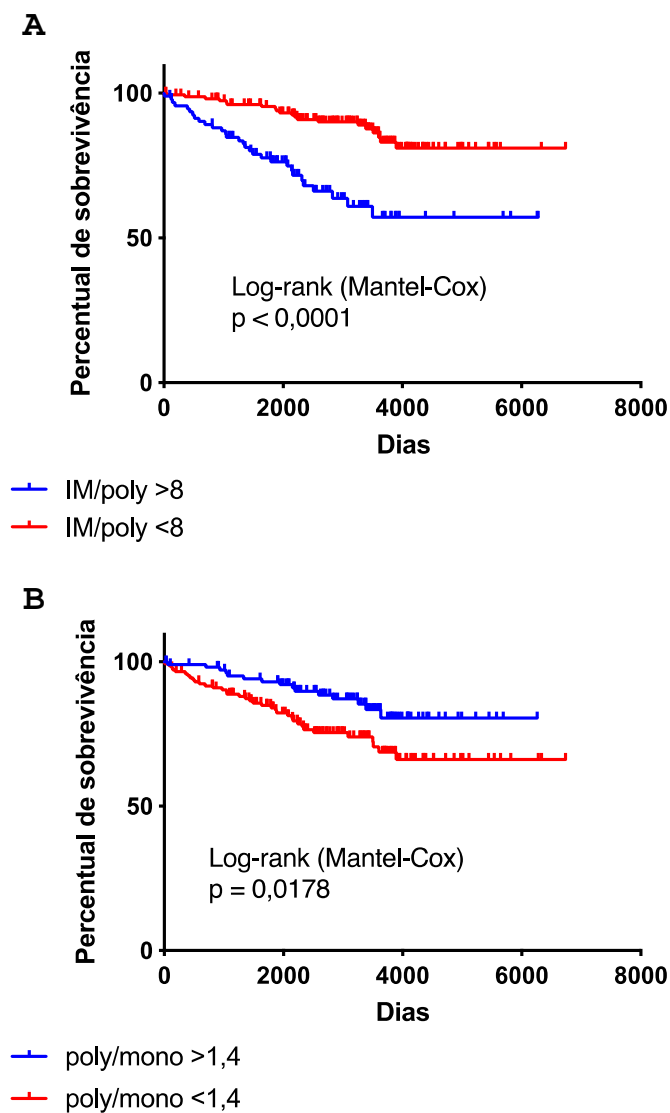


Figura 13 – Curvas de sobrevida livre de progressão analisando o impacto da taxa de tradução. **Painel A:** Análise de sobrevida livre de progressão levando-se em consideração as populações **vermelha** (razão entre índice mitótico/tradução menor que 8) e **azul** (razão entre índice mitótico/tradução maior que 8), ilustrando que a tendência da tradução estar relacionada a proliferação celular reflete um pior prognóstico. **Painel B:** Análise de sobrevida livre de progressão agora considerando apenas a taxa de tradução do tumor, mostrando que taxas maiores de tradução (**azul**), quando analisadas separadamente, também refletem em um melhor prognóstico.

As curvas de sobrevida livre de progressão consistem no tempo decorrido entre o início do tratamento e a progressão de doença ou morte por quaisquer causas. Entretanto, a sobrevida global é historicamente considerada também um desfecho

terapêutico de grande importância, sendo analisado como evento de interesse a morte por quaisquer causas. Além disso, agrega maior robustez a hipótese aqui proposta, se os mesmos achados fossem também confirmados na análise de sobrevida global.

Assim, a **Figura 14** mostra as curvas de sobrevida global, levando-se em consideração a razão índice mitótico/tradução (**painel A**) ou somente a taxa de tradução (**painel B**). Foi observado que tumores que apresentam a tradução mais comprometida com a proliferação celular apresentam pior prognóstico, conforme ilustrado no **painel A**, assim como tumores que apresentam taxas de tradução menores, exemplificado pelo **painel B** da **Figura 14**.

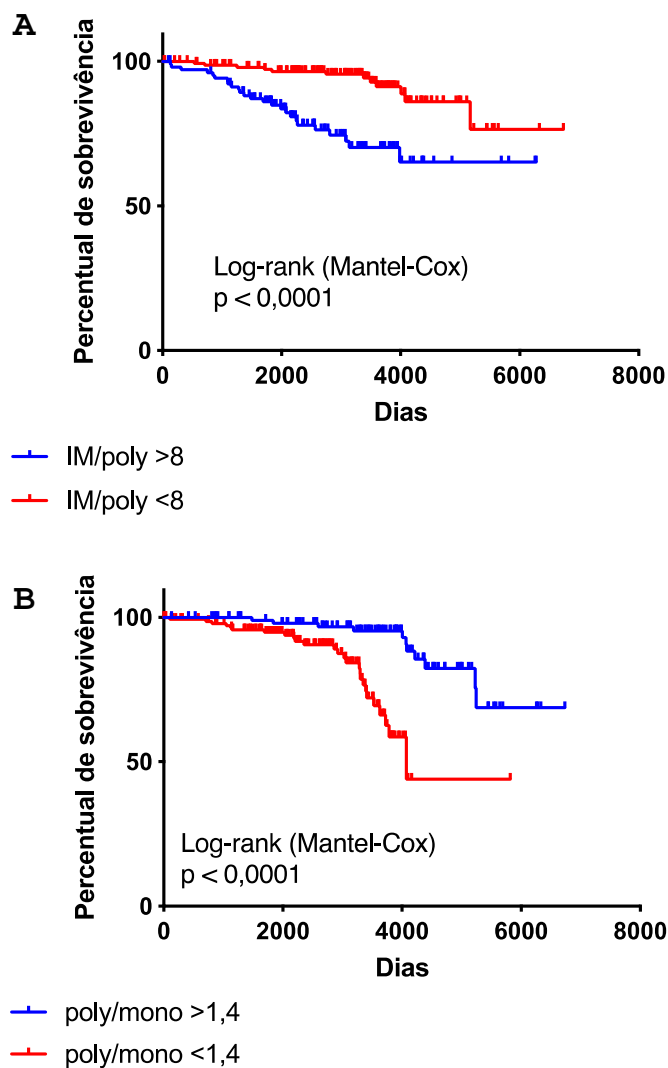


Figura 14 - Curvas de sobrevida global analisando o impacto da taxa de tradução. **Painel A:** Análise de sobrevida global levando-se em consideração as populações **vermelha** (razão entre índice mitótico/tradução menor que 8) e **azul** (razão entre índice mitótico/tradução maior que 8), ilustrando que a tendência da tradução estar relacionada a proliferação celular reflete um pior prognóstico. **Painel B:** Análise de sobrevida global agora considerando apenas a taxa de tradução do tumor, mostrando que taxas maiores de tradução (**azul**), quando analisadas separadamente, também refletem em um melhor prognóstico.

Uma vez identificada uma relação entre prognóstico, proliferação celular e tradução, o próximo passo foi analisar estas variáveis pela perspectiva molecular do câncer de mama, ou seja, nos grupos luminal A, luminal B e triplo negativo.

Inicialmente, foi analisado o índice mitótico entre estes 3 grupos moleculares. Era previsto, conforme observado na prática clínica desta patologia, que tumores classificados como luminal A tivessem índices mitóticos mais baixos, seguidos pelo tumores do tipo luminal B e triplo negativo. De fato, estas observações foram detectadas nesta casuística, conforme ilustrado no **painel A da Figura 15**.

Do ponto de vista da tradução, pelo observado até agora, tumores com menor taxa de tradução apresentam maiores índices proliferativos e piores prognósticos, o que é compatível com as características dos tumores mamários classificados como triplo negativos. Assim, foi analisada a taxa de tradução nos grupos mencionados acima. Interessantemente, as pacientes classificadas como luminal A apresentam taxas de tradução maiores que as pacientes do grupo luminal B e ainda maiores quando comparadas às triplo negativas. Estas observações estão ilustradas no **painel B da Figura 15**.

Desta maneira, a hipótese proposta torna-se ainda mais interessante. O grupo luminal A, classicamente descrito com melhor prognóstico (melhor sobrevida livre de progressão e melhor sobrevida global) em comparação aos demais, é o grupo que apresenta menos índice mitótico e maior taxa de tradução. Paralelamente, o grupo triplo negativo apresenta pior prognóstico na literatura desta patologia e, nos resultados aqui apresentados, também apresenta maiores índices mitóticos e menores taxas de tradução. Finalmente, o **painel C da Figura 15**, ilustra a razão entre índice mitótico/tradução, resumindo o fato dos tumores luminais A apresentarem uma menor razão, seguido dos tumores luminais B e triplo negativos.

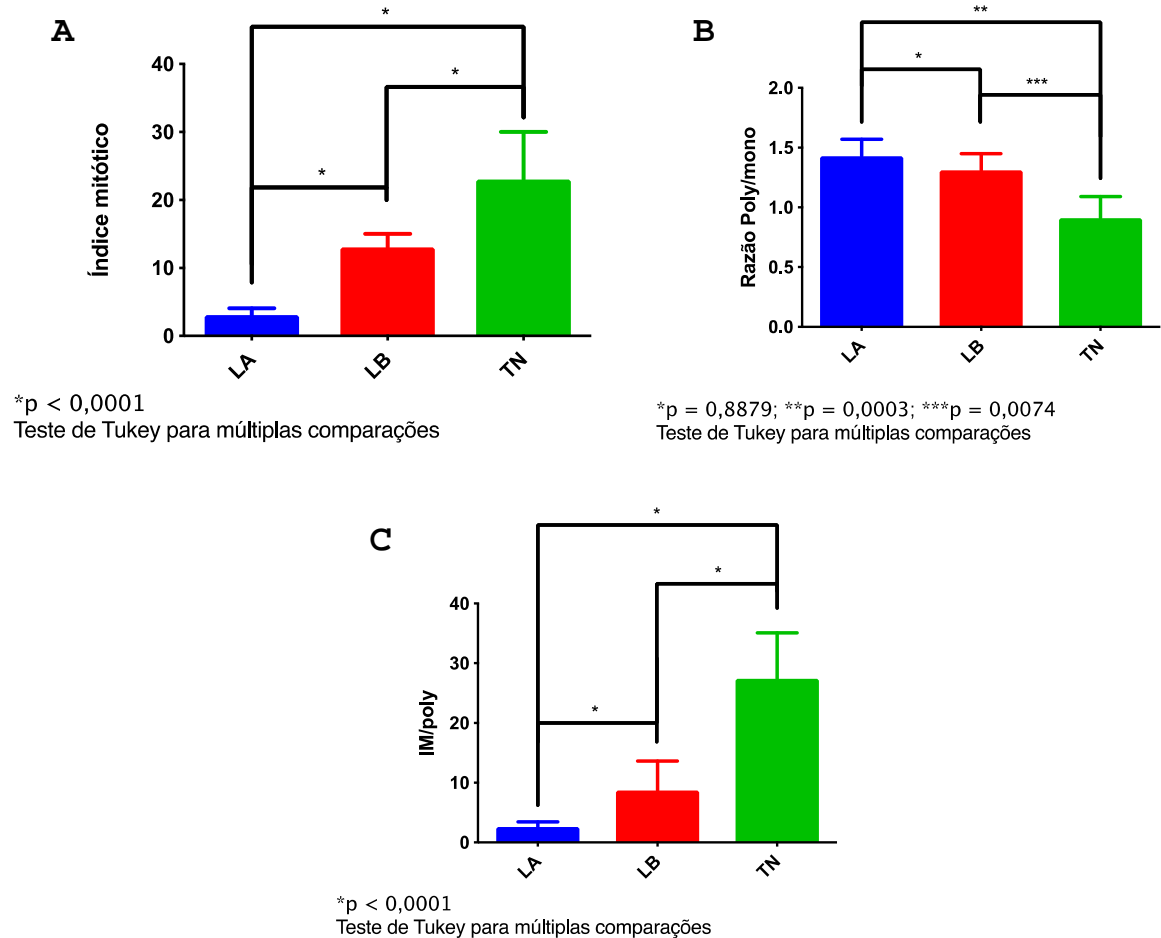
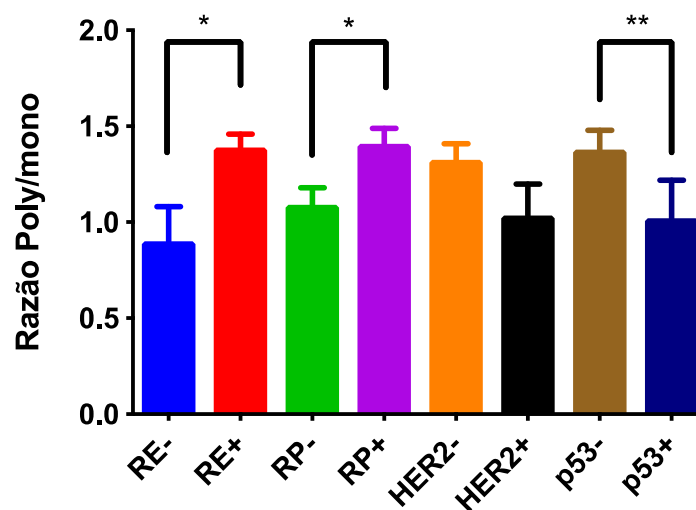


Figura 15 - Análise da relação entre índice mitótico e tradução por grupo molecular do câncer de mama. Os gráficos foram construídos levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% e os testes estatísticos assim como o nível de significância estão descritos abaixo de cada gráfico. **Painel A:** Relação do índice mitótico por subgrupo molecular da doença. **Painel B:** Relação da taxa de tradução (poly/mono) nos diferentes grupos moleculares. **Painel C:** Razão entre índice mitótico/tradução nos grupos luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo, respectivamente.

Uma análise adicional foi feita para corroborar a hipótese proposta até o momento. A taxa de tradução (poly/mono) foi relacionada com biomarcadores importantes (RE – receptor de estrogênio; RP – receptor de progesterona; p53). O foco foi verificar se a relação já observada que tumores do tipo triplo negativo apresentam taxas de tradução mais baixas, também era identificada ao analisar-se a

taxa de tradução com os biomarcadores mencionados. Assim, conforme ilustrado na **Figura 16**, é possível observar que RE negativo, RP negativo e p53 mutado apresentam uma relação estatisticamente significativa com taxas de tradução mais baixas. Este resultado era esperado, considerando que tumores classificados como triplo negativos não apresentam expressão dos receptores hormonais e apresentam maior incidência de mutações no gene p53 em relação aos tumores luminais.

Taxa de tradução vs. biomarcadores histopatológicos



* $p < 0,0001$; ** $p = 0,0227$

Teste de Sidak para múltiplas comparações

Figura 16 – Análise da relação entre os biomarcadores RE, RP e p53 com a taxa de tradução. O gráfico mostra a relação da taxa de tradução (poly/mono) com os biomarcadores RE, RP e p53. O teste estatístico, assim como os níveis de significância estão descritos abaixo do gráfico.

Por último, foi analisada uma variável clínica importante com a taxa de tradução: necrose. É observado na clínica que tumores mais proliferativos e maiores tendem a apresentar maior incidência de necrose. Este resultado também foi observado nesta casuística, conforme apresentado no **painel A** da **Figura 17**. Interessantemente, ao analisar a taxa de tradução (poly/mono), foi identificado que a ausência de necrose está relacionada com uma maior taxa de tradução e a presença desta variável com uma menor atividade traducional (**painel B; Figura 17**).

A relação entre tradução e necrose poderia ser explicada por duas hipóteses. Por um lado tumores que apresentaram maiores taxas de tradução são os correlacionados com menor proliferação e que justamente possuem menor incidência de necrose. Por outro lado, a necrose reconhecidamente causa estresse celular, o que poderia contribuir diretamente para uma redução na taxa de tradução. Por último, o **painel C** da **Figura 17** mostra a razão índice mitótico/tradução, evidenciando que maiores índices proliferativos e menos taxas de tradução apresentam maior incidência de necrose.

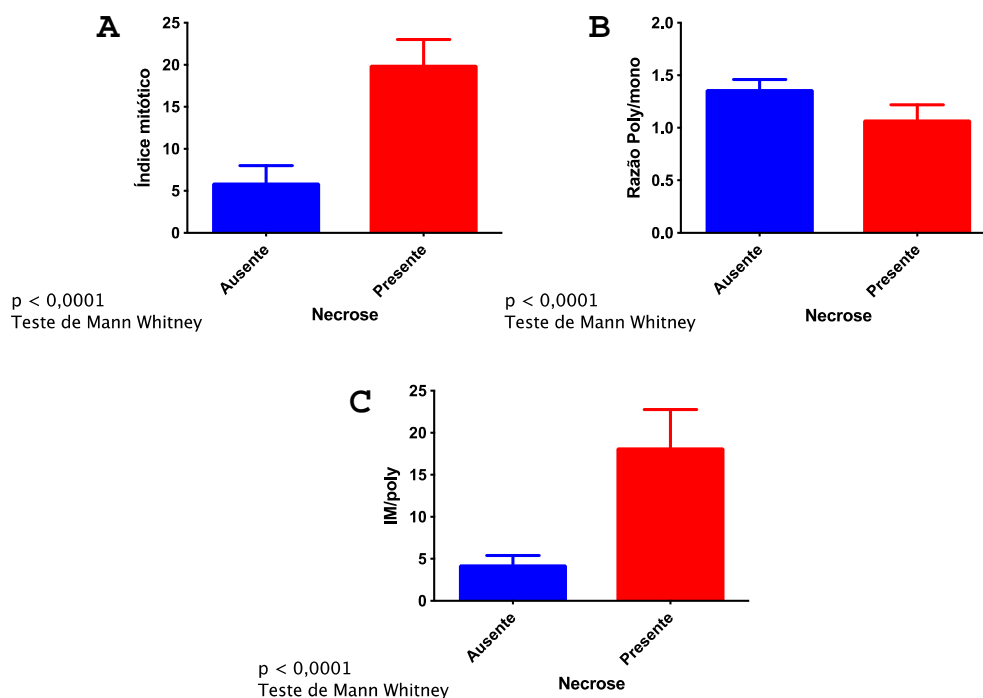


Figura 17 – Análise da relação entre necrose com a taxa de tradução. Os gráficos foram construídos levando-se em consideração um intervalo de confiança de 95% e os testes estatísticos assim como o nível de significância estão descritos abaixo de cada gráfico. **Painel A:** Relação do índice mitótico e incidência de necrose. **Painel B:** Relação da taxa de tradução (poly/mono) com incidência de necrose. **Painel C:** Razão entre índice mitótico/tradução e ausência/presença de necrose, respectivamente.

Assim, nossos resultados sugerem nas pacientes cujo tumor apresenta taxas de tradução menores e índices proliferativos maiores, existe uma tendência de pior prognóstico. Além disso, taxas de tradução maiores são um indicativo de melhor prognóstico. Considerando nossa hipótese de que uma tradução específica poderia ser um marcador de pior prognóstico no câncer de mama, analisamos a expressão protéica de 3 fatores de início de tradução, cuja alteração poderia contribuir para o fenótipo observado até o momento. Estes resultados são apresentados no capítulo a seguir.

3.3 ESTUDO DO IMPACTO DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRADUÇÃO eIF4E, eIF4G E eIF5A NO CURSO CLÍNICO DOS TUMORES INVASIVOS DA MAMA

Finalmente, este último capítulo discute a expressão proteica, identificada por IHQ, dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A em TMAs somente com amostras de carcinoma mamário invasivo. Os mesmos apresentam fortes indícios científicos com a hipótese de tradução específica. Conforme será mostrado nesta seção, tais fatores estão diretamente envolvidos com processos carcinogênicos e já foram relacionados, por outros autores, com o carcinoma mamário. Estas proteínas regulam a maquinaria de tradução de formas únicas: eIF4E regula a tradução geral dependente de *cap*, eIF4G é um fator crucial para os mRNAs traduzidos de forma dependente de IRES e eIF5A tem sido amplamente envolvido na elongação da tradução específica de um subgrupo de mRNAs. Estas características serão discutidas detalhadamente ao longo do texto e foram os principais motivos da escolha destes fatores para o desenvolvimento desta etapa do projeto.

3.3.1 Materiais e Método

3.3.1.1 Casuística

Para este objetivo foram selecionados 6 TMAs previamente construídos na instituição por outros pesquisadores e já utilizados em outros projetos de pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center. Após a exclusão de todos os *spots* dos TMAs que não possuíam representatividade tumoral, ou que não pudessem ser quantificados (por perda tecidual durante a técnica de IHQ) e exclusão dos casos que não possuíam

dados clínicos disponíveis ou levantados, um total de 278 amostras de carcinoma mamário invasivo, sem tratamento neoadjuvante e somente do sexo feminino restaram para as análises e conclusões. A distribuição por subtipo molecular foi de: 124 amostras do tipo Luminal A (44,6%), 91 amostras do tipo Luminal B (32,7%), 22 amostras do tipo HER2 (7,9%) e 41 amostras do tipo Triplo-Negativo (14,8%). Vale a pena destacar que foram excluídos todos os casos tratados com quimioterapia neoadjuvante, uma vez que esta pode modificar o padrão de expressão global. A distribuição dos TMAs utilizados foi a seguinte:

- a. TMA 41 – apenas amostras de carcinoma mamário invasivo, majoritariamente composto por casos classificados como ductal invasivo e somente tumores classificados como Triplo-Negativos;
- b. TMA 42 e 43 – amostras de carcinoma mamário invasivo, majoritariamente composto por casos classificados como ductal invasivo e tumores classificados como Luminais (Luminal A, Luminal B *HER2* negativo e Luminal B *HER2* positivo);
- c. TMA 45 e 46 – amostras de carcinoma mamário invasivo, majoritariamente composto por casos classificados como ductal invasivo e tumores mistos classificados como Luminais (Luminal A, Luminal B *HER2* negativo e Luminal B *HER2* positivo), Triplo-Negativos e *HER2* amplificados;
- d. TMA *HER2* – amostras de carcinoma mamário invasivo, majoritariamente composto por casos classificados como ductal invasivo e tumores somente com amplificação do gene *HER2*.

3.3.1.2 Reação de imuno-histoquímica (As principais características desta metodologia estão resumidas na Tabela 5)

As lâminas foram armazenadas em geladeira até o momento da reação com a finalidade de preservar a estabilidade físico-química das macromoléculas do material. Todas passaram pela série de xilol 100% por 3 vezes, imergindo os cortes completamente por 10 minutos em cada cuba. Este processo é suficiente para retirar o conteúdo de parafina presente na lâmina. Para hidratar o material, todas as lâminas passaram pela séria de etanol (EtOH) absoluto por 4 vezes, imergindo por 1 minuto em cada cuba. Todas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e mantidas em água até o momento da recuperação antigênica. Após este processo, cada lâmina foi ambientada com tampão PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, H₂O q.s.p.) pH=7,2 por 2 vezes de 5 minutos. A recuperação antigênica foi feita com tampão a base de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), preparado no momento do uso, na concentração de 10 mM, pH=6,0. Particularmente, para cada anticorpo utilizado neste capítulo, foi aplicada uma metodologia física para recuperação antigênica, conforme descrito: eIF4E (Santa Cruz Biotechnology® sc-9976) – foi feito em banho-maria a 96°C por 40 minutos; eIF4G (Santa Cruz Biotechnology® sc-133155) – foi aplicado micro-ondas por dois períodos de 5 minutos, na potência máxima, com 5 minutos de intervalo; eIF5A (Santa Cruz Biotechnology® sc-390202) – foi feito em banho-maria a 96°C por 40 minutos.

Para a segunda etapa da metodologia, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e lavadas com água deionizada 2 vezes por 5 minutos, seguindo de uma ambientação com solução PBS 1X pH=7,2 por 5 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada utilizando solução de H₂O₂

(peróxido de hidrogênio) 10V, lavando cada lâmina 4 vezes por 5 minutos. Já as reações inespecíficas foram bloqueadas com solução de Protein Block (abcam® - ab64226) por 5 minutos, em temperatura ambiente, dentro de câmara úmida). Os anticorpos primários foram aplicados por um período de 12 a 16 horas (*overnight*) a 4°C diluído em Tris-HCl (50 mM) pH 7,5 + 1% BSA, na seguinte titulação: eIF4E – 1:100; eIF4G – 1:25; eIF5A – 1:100.

A revelação foi feita com o sistema Kit Dako® (Liquid DAB + Substrate Chromogen System – K3468). Cada lâmina foi lavada com solução PBS 1X pH=7,2 por 5 minutos e aplicadas com o reagente HRP link (Dako® - K4068) 1 vez por 30 minutos em temperatura ambiente dentro de câmara úmida. Após este processo, o material foi lavado com solução PBS 1X pH=7,2 por 5 minutos e foi aplicado o reagente HRP enzyme (Dako® - K4068) 1 vez por 30 minutos. Finalmente, cada lâmina foi lavada com solução PBS 1X pH=7,2 por 5 minutos e aplicadas com o reagente DAB na proporção de 1:50, conforme recomendações do fabricante para revelação. A reação foi parada com H₂O deionizada e todas as lâminas foram coradas com hematoxilina por 1 minuto. Para análise em microscópio do resultado, as lâminas foram montadas utilizando meio de montagem aquoso (Dako® - S3025) seguindo recomendações do fabricante.

Tabela 5 - Sumário com as principais características e condições aplicadas nas reações de imunohistoquímica realizadas neste capítulo.

Anticorpo	Clone	Recuperação antigênica	Bloqueio proteico	Tempo de incubação	Título do anticorpo	Fabricante
eIF4E	Monoclonal (P-2), coelho (sc-9976)	Tampão Citrate 10 mM pH 6,0	abcam Protein Block	ON** 4°C	1:100	Santa Cruz Biotechnology
eIF4G	Monoclonal (A-10), camundongo (sc-133155)	Tampão Citrate 10 mM pH 6,0	abcam Protein Block	ON** 4°C	1:25	Santa Cruz Biotechnology
eIF5A	Monoclonal (H-8), camundongo (sc-390202)	Tampão Citrate 10 mM pH 6,0	abcam Protein Block	ON** 4°C	1:100	Santa Cruz Biotechnology

** ON = *overnight*

3.3.1.3 Quantificação das reações de imuno-histoquímica e determinação do *HSCORE*

As lâminas foram digitalizadas no aparelho ScanScope XT (Aperio). A intensidade de marcação de cada anticorpo foi avaliada na célula total através do *software* ImageScope (Aperio), que verifica intensidade e porcentagem de *pixels* marcados. A partir destes dados, o *HSCORE* foi calculado de acordo com a fórmula: $HSCORE = \sum(i \times P_i)$, onde P_i = porcentagem de *pixels* positivos, com variação de 0% a 100% e intensidade de marcação do *pixel* $i = 0, 1, 2$ ou 3 . Desta forma, a variação do *HSCORE* é de 0 a 300. A utilização do ScanScope XT (Aperio) considera a validação deste equipamento realizada por (ALVARENGA et al. 2017).

Como foram utilizados TMAs em lâminas independentes para abrigar todos os casos disponíveis, realizamos uma normalização adicional para contemplar possíveis diferenças entre as lâminas que poderiam ser geradas durante o procedimento experimental. Para esta normalização, foi realizada uma média dos

HSCOREs de todos os spots das duas lâminas e o HSCORE de cada ponto foi dividido pela média:

$$\text{HSCORE}_{\text{normalizado}} = \text{HSCORE} / \bar{x}_{(\text{HSCORE})}$$

Os resultados foram analisados através do software Graphpad ou SPSS para Windows (versão 15.0) e os níveis quantitativos de expressão das proteínas foram correlacionados com diferentes parâmetros, como grupo molecular, expressão de receptores hormonais e amplificação de *HER2*, permitindo gerar conclusões a respeito da participação dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A na evolução da doença.

3.3.1.4 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi usado o programa R versão 3.3.0 para maximização do ponto de corte, proposta por LAUSEN e SCHUMACHER (1992) e determinação das curvas de sobrevida. Consideramos a estatística de long-rank maximizada selecionada para pontos de corte entre 5 % e 95% de quantificação de medida contínua (delta T). Esta etapa é fundamental para determinar, mediante a distribuição dos valores em um determinado grupo, o ponto que categoriza a distribuição em baixa expressão e alta expressão. Assim, é possível determinar o impacto da expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A na sobrevida global e câncer-específica das pacientes analisadas. O programa IBM SPSS versão 23 foi empregado para os demais testes estatísticos. Em todos os casos adotamos um nível de significância para p de 5%. Na **Figura 18** e **Figura 19** pode-se notar os gráficos (respectivamente para as análises de Sobrevida Livre de Doença (SLD) e Sobrevida Câncer-Específica (SCE) que a metodologia de maximização do ponto de corte,

comparando todos os valores possíveis de separação (eixo X) e a diferença entre os grupos gerados (eixo Y). Os demais testes estatísticos utilizados ao longo do capítulo são indicados nas tabelas ilustrativas.

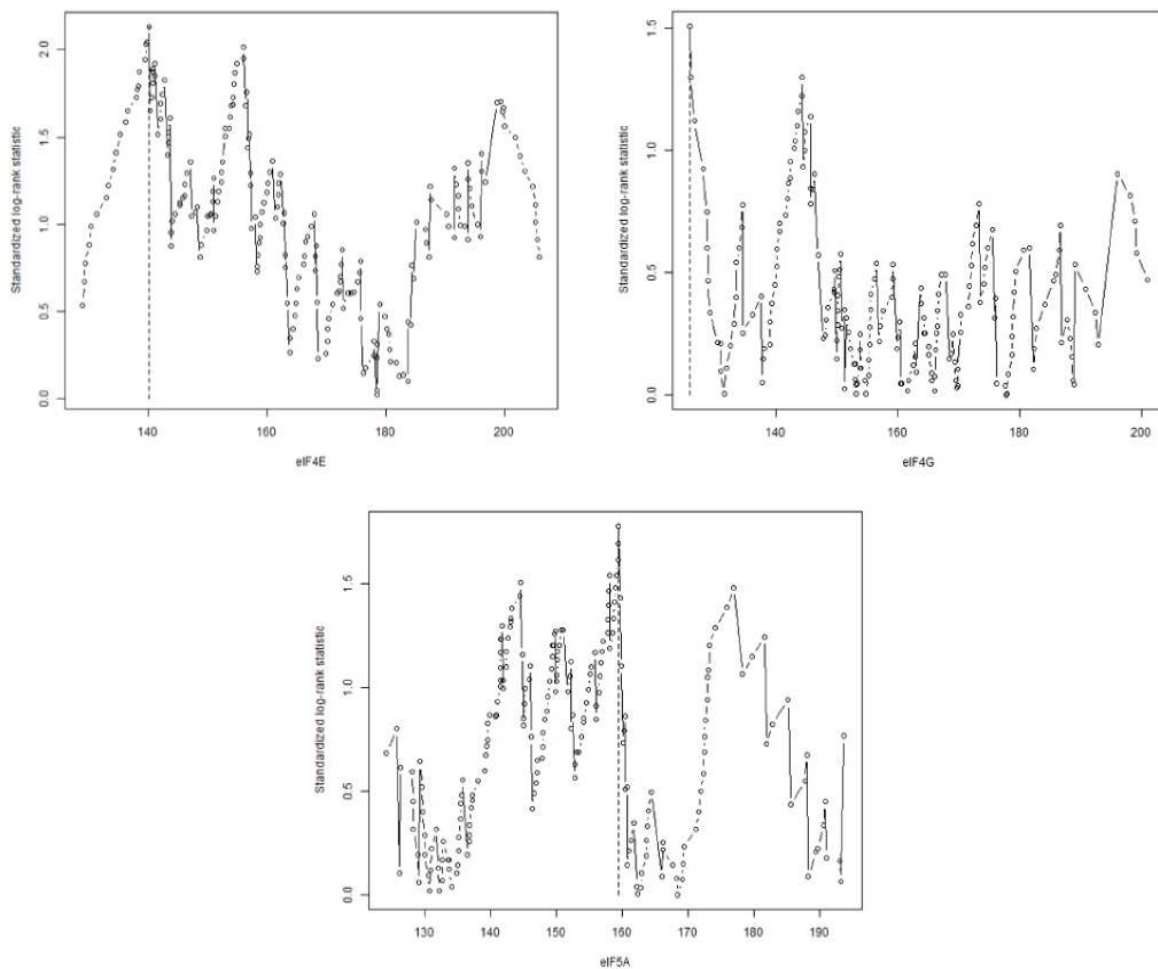


Figura 18 - Demonstração gráfica da determinação dos pontos de corte para distribuir as pacientes analisadas em grupos de baixa expressão e alta expressão (SLD). Os valores estão baseados no HScore identificado para cada fator de tradução, sendo que para eIF4E o ponto de corte foi de 140; para eIF4G o ponto de corte foi de 126 e para eIF5A o ponto de corte foi de 159. Estes pontos determinam grupos de baixa ou alta expressão para tais marcadores. Esta informação foi determinante para análise de sobrevida livre doença das pacientes.

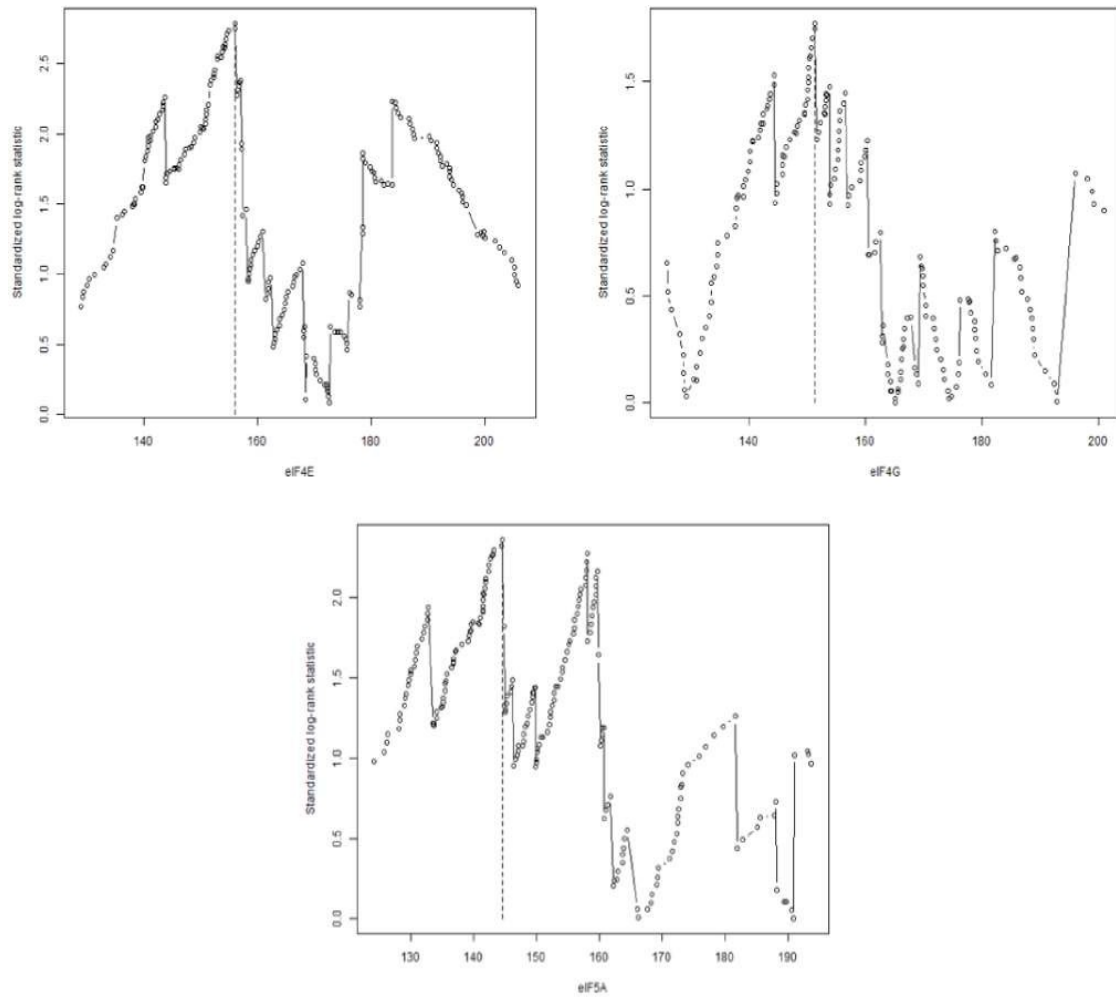


Figura 19 - Demonstração gráfica da determinação dos pontos de corte para distribuir as pacientes analisadas em grupos de baixa expressão e alta expressão (SCE). Os valores estão baseados no HScore identificado para cada fator de tradução, sendo que para eIF4E o ponto de corte foi de 156; para eIF4G o ponto de corte foi de 151 e para eIF5A o ponto de corte foi de 144. Estes pontos determinam grupos de baixa ou alta expressão para tais marcadores. Esta informação foi determinante para análise de sobrevida câncer específica das pacientes.

3.3.2 Resultados e discussão deste objetivo

3.3.2.1 Descrição da casuística utilizada neste capítulo e ilustração da morfologia tecidual marcada por imuno-histoquímica identificando os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A

O foco deste capítulo foi avaliar o impacto da expressão diferencial de fatores de tradução, previamente selecionados, na biologia do carcinoma mamário do tipo invasivo, porém sob a ótica dos grupos moleculares clinicamente definidos para estas pacientes. As análises descritivas e estatísticas a seguir estão ilustradas e discutidas com este enfoque. Assim, a **Tabela 6**, descreve a distribuição das principais variáveis clínicas coletadas nos 4 grupos moleculares (Luminal A, Luminal B, *HER2* e Triplo-Negativo).

Já na **Tabela 7**, estão organizadas as informações histopatológicas. Conforme esperado para esta patologia, alguns padrões foram observados, como a maioria das pacientes luminais apresentam tumores classificados como T1. Além disso, estas mesmas pacientes apresentam tumores mais diferenciados, o que é refletido na classificação do grau histológico em I e II, em sua maioria. Porém, nos tumores *HER2* e triplo-negativos, formas mais agressivas e com células mais desdiferenciadas, a maioria é classificada com grau histológico III. Um maior crescimento da massa tumoral também pode ser relacionado com uma maior presença de necrose, o que também foi constatado ao se verificar que 77% dos tumores Luminais A não apresentavam necrose no tumor ressecado, comparados aos 44% dos tumores Triplo-Negativos que não apresentam necrose. Portanto, a casuística contemplada nos TMAs utilizados neste objetivo do projeto representam adequadamente os grupos moleculares do câncer de mama, revelando tendências e

comportamento clínicos das pacientes conforme o amplamente descrito na literatura para esta patologia.

Tabela 6 - Distribuição das variáveis clínicas (histórico de câncer de mama ou de qualquer outro tumor na família, menopausa, estadiamento clínico, recorrência e óbito) nos 4 grupos moleculares utilizados na rotina clínica do câncer de mama.

Variável n (%)		Luminal A (= 124) [44,6%]	Luminal B (n = 91) [32,7%]	HER2 (n = 22) [7,9%]	Triplo- Negativo (n = 41) [14,8%]	Total (n = 278) [100%]
Histórico de câncer de mama na família	presente	49 (39,5)	46 (50,5)	13 (59,1)	18 (43,9)	126 (45,3)
	ausente	55 (44,3)	33 (36,2)	7 (31,8)	17 (41,4)	112 (40,3)
	sem informação	20 (16,2)	12 (13,3)	2 (9,1)	6 (14,7)	40 (14,4)
Histórico de câncer na família	presente	34 (27,4)	32 (35,2)	7 (31,8)	14 (34,1)	87 (31,3)
	ausente	68 (54,8)	44 (48,3)	13 (59,1)	21 (51,2)	146 (52,5)
	sem informação	22 (17,8)	15 (16,5)	2 (9,1)	6 (14,7)	45 (16,2)
Menopausa	pré	39 (31,4)	26 (28,6)	11 (50,0)	16 (39,0)	92 (33,1)
	pós	68 (54,8)	52 (57,1)	11 (50,0)	16 (39,0)	147 (52,9)
	sem informação	17 (13,8)	13 (14,3)	0 (0,0)	9 (22,0)	39 (14,0)
Estadiamento clínico	1	48 (38,7)	29 (31,9)	1 (4,5)	11 (26,8)	89 (32,0)
	2	41 (33,1)	27 (29,7)	8 (36,3)	18 (43,9)	94 (33,8)
	3	12 (9,7)	16 (17,6)	12 (54,5)	5 (12,2)	45 (16,2)
	4	6 (4,8)	11 (12,1)	0 (0,0)	1 (2,4)	18 (6,5)
	sem informação	17 (13,7)	8 (8,7)	1 (4,7)	6 (14,7)	32 (11,5)
Recorrência	não ocorreu	111 (89,5)	77 (84,6)	14 (63,6)	32 (78,0)	234 (84,2)
	ocorreu	13 (10,5)	14 (15,4)	8 (36,4)	9 (22,0)	44 (15,8)
	sem informação	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Óbito	viva	113 (91,1)	84 (92,3)	17 (77,3)	35 (85,4)	249 (89,6)
	morta	11 (8,9)	7 (7,7)	5 (22,7)	6 (14,6)	29 (10,4)
	sem informação	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Tabela 7 - Distribuição das variáveis histopatológicas (TNM, tipo histológico, grau histológico e nuclear, presença de necrose e/ou inflamação e invasão endotelial, linfática ou perineural) nos 4 grupos moleculares utilizados na rotina clínica do câncer de mama.

Variável n (%)		Luminal A (n = 124) [44,6%]	Luminal B (n = 91) [32,7%]	HER2 (n = 22) [7,9%]	Triplo- Negativo (n = 41) [14,8%]	Total (n = 278) [100%]
T	T1	73 (58,9)	33 (36,3)	3 (13,6)	18 (43,9)	127 (45,7)
	T2	34 (27,4)	39 (42,8)	9 (40,9)	18 (43,9)	100 (36,0)
	T3	6 (4,8)	10 (11,0)	8 (36,4)	2 (4,9)	26 (9,3)
	sem informação	11 (8,9)	9 (9,9)	2 (9,1)	3 (7,3)	25 (9,0)
N	negativo	70 (56,4)	45 (49,4)	7 (31,8)	26 (63,4)	148 (53,2)
	positivo	43 (34,7)	37 (40,6)	13 (59,1)	11 (26,8)	104 (37,4)
	sem informação	11 (8,9)	9 (10,0)	2 (9,1)	4 (9,8)	26 (9,4)
M	negativo	109 (87,9)	73 (80,2)	20 (90,9)	37 (90,2)	239 (85,9)
	positivo	4 (3,2)	11 (12,1)	0 (0,0)	1 (2,4)	16 (5,7)
	sem informação	11 (8,9)	7 (7,7)	2 (9,1)	3 (7,4)	23 (8,4)
Tipo histológico	CDI ¹	104 (83,9)	81 (89,0)	22 (100,0)	36 (87,8)	243 (87,4)
	CLI ²	16 (12,9)	5 (5,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	21 (7,6)
	outros	4 (3,2)	5 (5,5)	0 (0,0)	5 (12,2)	14 (5,0)
	sem informação	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Grau histológico	I	34 (27,4)	17 (18,7)	1 (4,5)	1 (2,4)	53 (19,1)
	II	67 (54,0)	50 (54,9)	5 (22,7)	9 (21,9)	131 (47,1)
	III	21 (16,9)	23 (25,3)	16 (72,7)	30 (73,2)	90 (32,4)
	sem informação	2 (1,7)	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (2,5)	4 (1,4)
Grau nuclear	1	9 (7,2)	6 (6,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (5,4)
	2	51 (41,1)	27 (29,7)	2 (9,1)	3 (7,3)	83 (29,8)
	3	62 (50,0)	58 (63,7)	20 (90,9)	37 (90,2)	177 (63,6)
	sem informação	2 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,5)	3 (1,2)
Necrose	ausente	111 (89,5)	73 (80,2)	15 (68,2)	17 (41,5)	216 (77,7)
	presente	10 (8,1)	17 (18,7)	6 (27,3)	21 (51,2)	54 (19,4)
	sem informação	3 (2,4)	1 (1,1)	1 (4,5)	3 (7,3)	8 (2,9)
Inflamação	ausente	93 (75,0)	55 (60,4)	12 (54,5)	6 (14,6)	166 (59,7)
	presente	28 (22,6)	35 (38,5)	10 (45,5)	33 (80,5)	106 (38,1)
	sem informação	3 (2,4)	1 (1,1)	0 (0,0)	2 (4,9)	6 (2,2)
Invasão endotelial	ausente	119 (95,9)	85 (93,4)	21 (95,5)	37 (90,2)	262 (94,2)
	presente	2 (1,6)	5 (5,5)	1 (4,5)	3 (7,3)	11 (3,9)
	sem informação	3 (2,5)	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (2,5)	5 (1,9)
Invasão linfática	ausente	95 (76,6)	74 (81,3)	12 (54,5)	31 (75,6)	212 (76,2)
	presente	26 (20,9)	16 (17,6)	10 (45,5)	9 (21,9)	61 (21,9)
	sem informação	3 (2,5)	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (2,5)	5 (1,9)
Invasão perineural	ausente	100 (80,6)	85 (93,4)	21 (95,5)	37 (90,2)	243 (87,4)
	presente	21 (16,9)	5 (5,5)	1 (4,5)	3 (7,3)	30 (10,8)
	sem informação	3 (2,5)	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (2,5)	5 (1,8)

1 – Carcinoma Ductal Invasivo; 2 – Carcinoma Lobular Invasivo

As reações de imuno-histoquímica aqui apresentadas foram feitas em colaboração com a aluna de doutorado Mayara Carolinne Silva Botelho (IQ – USP). As reações foram inicialmente padronizadas em cortes inteiros de carcinoma mamário invasivo para, então, as reações finais serem realizadas nos TMAs, conforme descrito na seção de Material e Métodos deste capítulo. Exemplos representativos estão ilustrados para os fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A nas **Figuras 20, 21 e 22**, respectivamente. É interessante observar que a marcação destas proteínas é exclusivamente citoplasmática, o que é esperado pela biologia da maquinaria de tradução. Não é descrito na literatura qualquer processo traducional de algum mRNA que ocorra no núcleo ou a localização de componentes da maquinaria ancorados a membrana citoplasmática. Além disso, os fatores testados neste objetivo, são componentes essenciais para qualquer célula eucariótica, ou seja, não existe tecido humano que não expresse estes fatores de tradução (eIF4E, eIF4G e eIF5A). Por esta razão, é comparada a expressão diferencial entre as amostras tumorais utilizadas, com foco na classificação molecular da doença.

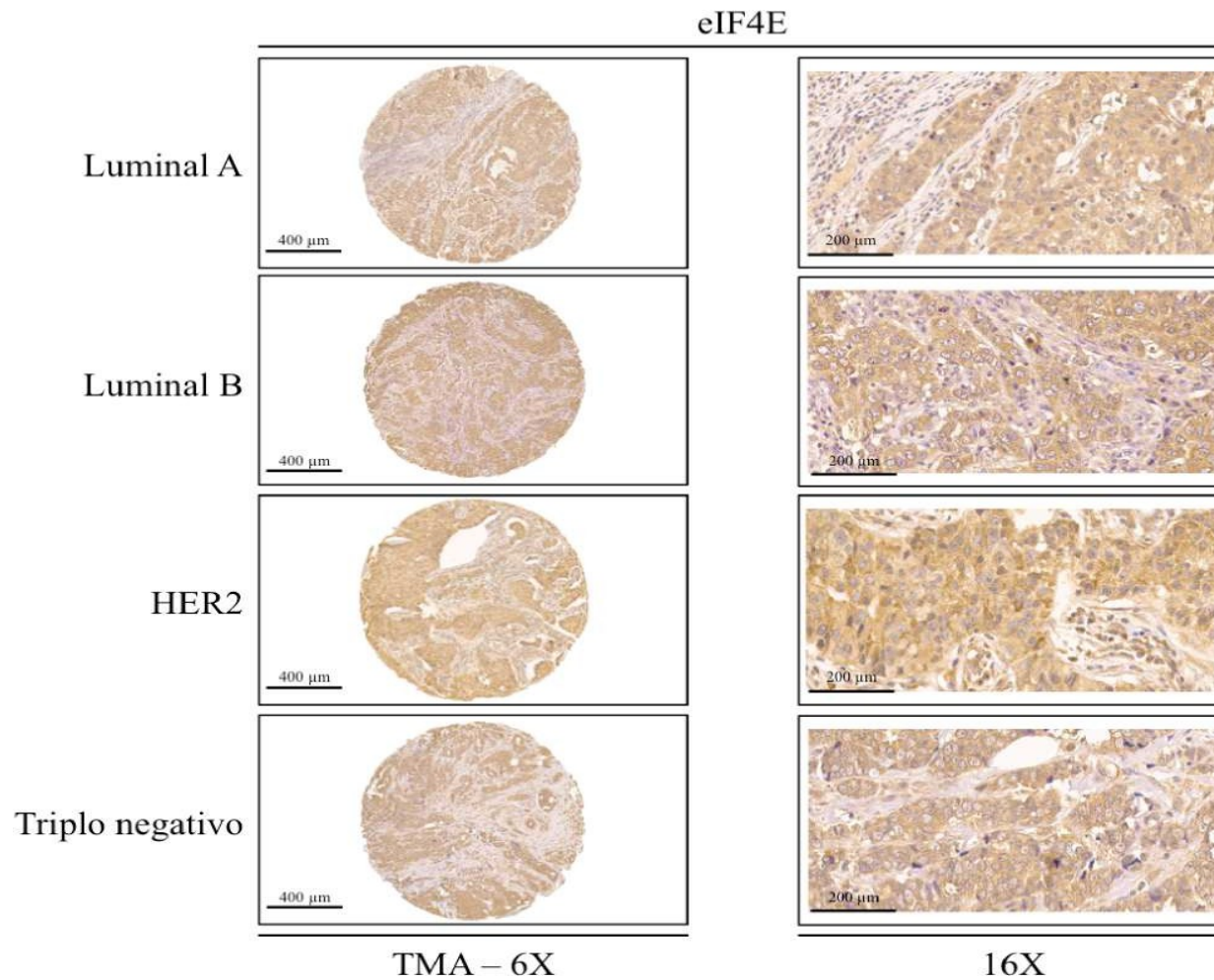


Figura 20 - Paineil ilustrativo, representando um *spot* de cada subtipo molecular e a marcação com eIF4E. Ilustração, também em campo de maior aumento, permitindo a visualização da morfologia do tecido e marcação predominantemente no tumor e exclusivamente citoplasmática.

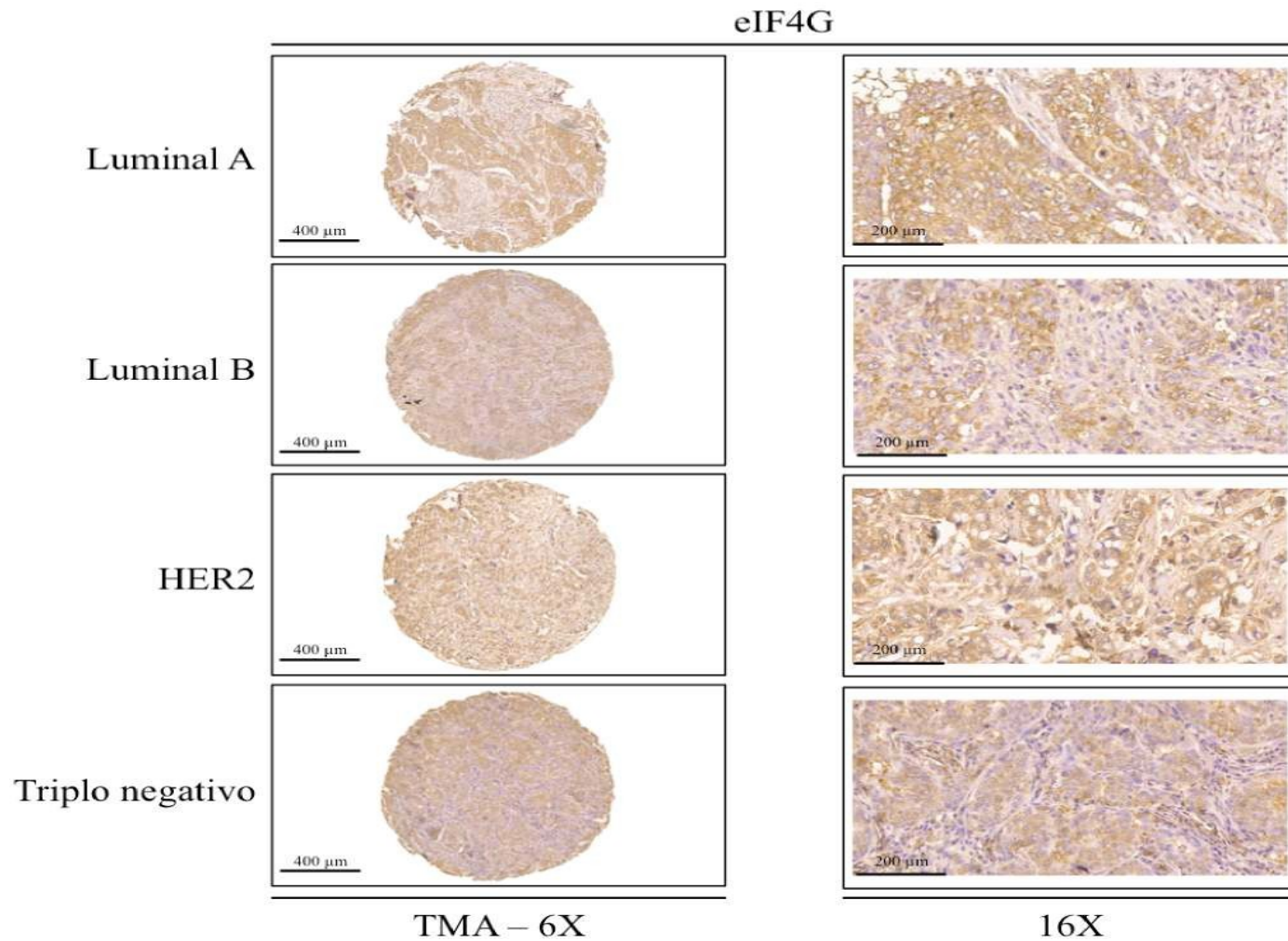


Figura 21 - Painel ilustrativo, representando um *spot* de cada subtipo molecular e a marcação com eIF4G. Ilustração, também em campo de maior aumento, permitindo a visualização da morfologia do tecido e marcação predominantemente no tumor e exclusivamente citoplasmática.

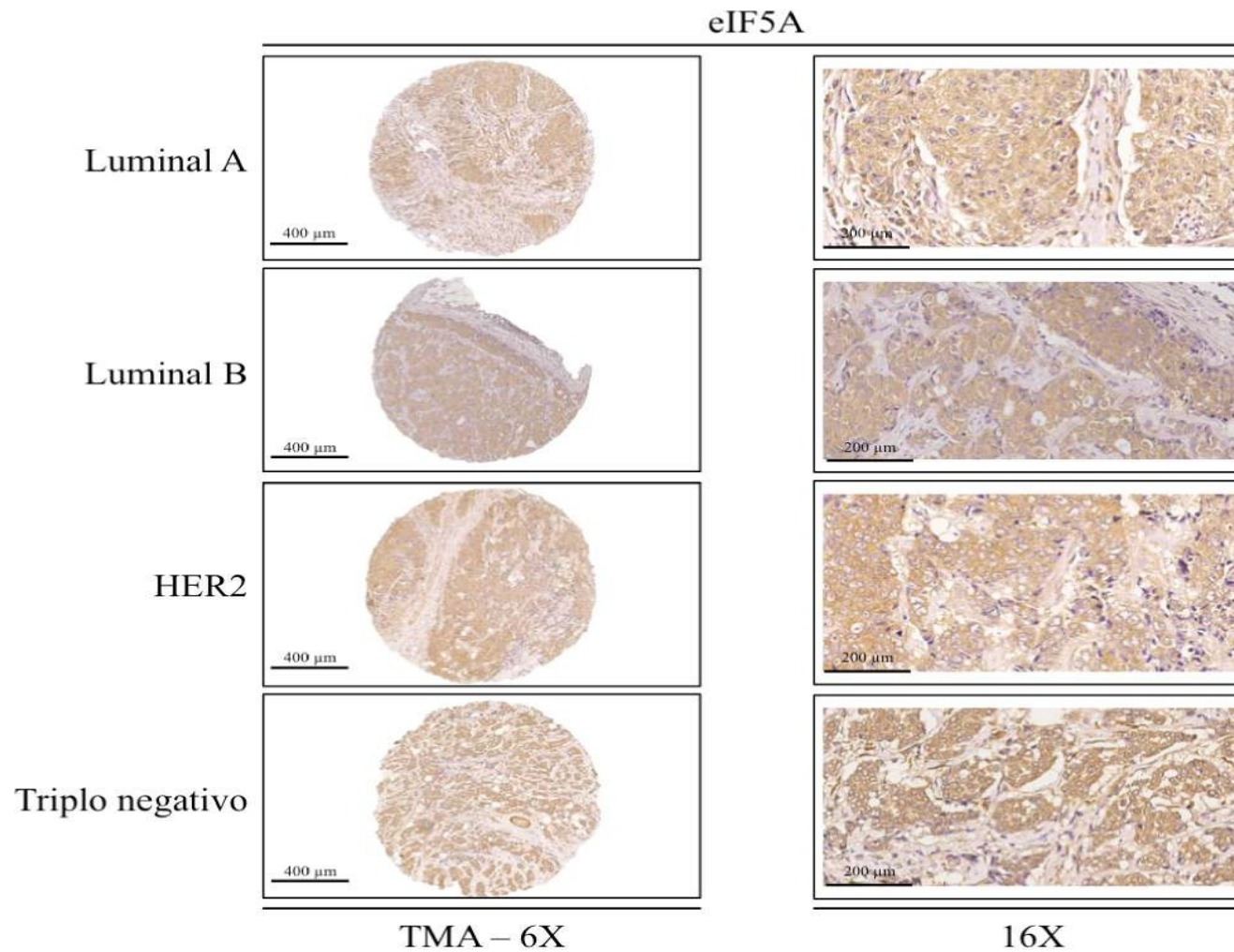


Figura 22 - Painel ilustrativo, representando um *spot* de cada subtipo molecular e a marcação com eIF5A. Ilustração, também em campo de maior aumento, permitindo a visualização da morfologia do tecido e marcação predominantemente no tumor e exclusivamente citoplasmática.

Posteriormente, as principais variáveis quantitativas foram distribuídas por subgrupo molecular, com o objetivo de verificar, estatisticamente, alguma diferença relevante. Assim, idade ao diagnóstico, tamanho do tumor (cm) no momento da cirurgia, índice mitótico, expressão dos receptores hormonais, amplificação do gene *HER2*, expressão do biomarcador para proliferação celular Ki67 e a expressão dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A determinada por imuno-histoquímica. Interessantemente, todas estas variáveis, de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes, demonstraram apresentar uma distribuição diferente em pelo menos um dos grupos moleculares, com exceção da idade ao diagnóstico que, embora não tenha apresentado significância estatística, foi possível observar uma tendência dos tumores luminais serem diagnosticados em idades mais elevadas. Desta forma, nosso principal resultado foi identificar que, de fato, existe uma expressão diferencial dos fatores de tradução testados em, pelo menos, um dos grupos moleculares do câncer de mama. Estas observações estão ilustradas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Distribuição das principais variáveis quantitativas entre os 4 grupos moleculares utilizados na rotina clínica do câncer de mama.

Variável	Grupo Molecular	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	p
Idade	Luminal A	124	37,0	55,6	54,0	88,0	11,6	NE ¹
	Luminal B	91	29,0	54,1	54,0	78,0	10,9	
	HER2	22	27,0	49,9	47,0	80,0	14,5	
	Triplo Negativo	41	36,0	51,1	49,0	82,0	11,3	
	Total	278	27,0	54,0	53,0	88,0	11,7	
Tamanho do tumor (cm)	Luminal A	118	0,4	2,0	1,5	16,0	1,9	< 0,05
	Luminal B	80	0,1	2,3	2,0	7,0	1,5	
	HER2	20	0,3	2,7	2,5	8,0	2,0	
	Triplo Negativo	37	0,4	2,5	2,1	7,0	1,6	
	Total	255	0,1	2,2	1,7	16,0	1,8	
Índice mitótico	Luminal A	121	0,0	5,7	4,0	36,0	6,1	< 0,05
	Luminal B	89	0,0	9,6	6,0	57,0	10,4	
	HER2	22	1,0	14,3	13,0	50,0	11,9	
	Triplo Negativo	39	1,0	23,0	20,0	85,0	17,9	
	Total	271	0,0	10,2	6,0	85,0	11,9	
Ki67 (IHQ)	Luminal A	109	0,0	4,5	1,0	15,0	4,7	< 0,05
	Luminal B	67	0,0	25,2	20,0	75,0	20,5	
	HER2	19	1,0	21,7	15,0	80,0	21,5	
	Triplo Negativo	33	0,0	34,2	30,0	95,0	27,1	
	Total	228	0,0	16,3	10,0	95,0	20,3	
eIF4E (HSCORE)	Luminal A	102	119,3	159,0	158,1	217,3	21,0	< 0,05
	Luminal B	79	117,8	171,1	167,9	221,3	26,9	
	HER2	19	131,3	159,5	152,5	193,2	18,6	
	Triplo Negativo	31	122,1	172,2	172,2	206,7	19,8	
	Total	231	117,8	164,9	162,0	221,3	23,6	
eIF4G (HSCORE)	Luminal A	96	123,9	156,9	155,4	207,7	17,4	< 0,05
	Luminal B	64	112,7	166,7	164,3	207,4	23,6	
	HER2	19	133,4	161,1	162,5	190,8	17,2	
	Triplo Negativo	36	72,9	147,4	143,9	210,9	33,6	
	Total	215	72,9	158,6	156,5	210,9	23,5	
eIF5A (HSCORE)	Luminal A	107	109,9	147,0	143,2	200,4	17,8	< 0,05
	Luminal B	67	121,4	162,4	158,1	224,3	22,4	
	HER2	21	118,3	152,6	156,8	191,1	16,9	
	Triplo Negativo	33	129,3	160,1	155,2	225,5	22,8	
	Total	228	109,9	154,0	150,4	225,5	21,0	

1 – Não estatístico

Uma abordagem estatística, em relação às variáveis qualitativas, também foi feita. Porém, não se encontrou nenhum resultado relevante a ser discutido e apresentado neste capítulo. O leitor, caso tenha interesse em uma visão geral destes resultados, poderá encontrar as tabelas e descrições reunidos no **Apêndice 1** desta tese.

3.3.2.2 Análise da expressão proteica diferencial dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A nos subgrupos moleculares do carcinoma mamário

Uma vez identificada a expressão diferencial dos componentes da maquinaria de tradução aqui estudados, a próxima etapa foi avaliar a correlação dos fatores com biomarcadores importantes para a biologia do câncer de mama: RE, RP e *HER2*. Para esta finalidade, foi determinado inicialmente o coeficiente ρ de Spearman (R) em todas as amostras, sem distinção por subgrupo molecular. Esta correlação inicial ilustrou resultados interessantes descritos a seguir. Os resultados mostrados abaixo foram estatisticamente significativos e o leitor pode encontrar uma visão global desta análise na **Tabela 9**.

O fator eIF4E se correlacionou positiva e fortemente com o fator eIF4G ($R = 0,61$) e com o fator eIF5A ($R = 0,69$), o que está destacado em **amarelo** na **Tabela 9**. A expressão eIF5A também se correlacionou de forma positiva e forte com eIF4G ($R = 0,53$), destacado em **verde** na mesma tabela. Este resultado indica que o aumento da expressão de eIF4E é acompanhado de forma positiva com um aumento concomitante na expressão de eIF4G e também eIF5A. Este resultado sugere que, por estes fatores serem cruciais para a tradução de populações importantes de mRNAs, é coerente que todos aumentem de forma proporcional, uma vez que a maquinaria de tradução está atuando de forma mais acelerada nas células tumorais

em relação as células normais.

Tabela 9 - Correlação entre a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A com os principais biomarcadores no câncer de mama (análise estatística calculada por meio do coeficiente ρ de Spearman).

	rô de Spearman	eIF4E	eIF4G	eIF5A
eIF4E	Coeficiente de Correlação	1	,610**	,686**
	n	231	190	195
eIF4G	Coeficiente de Correlação	,610**	1	,529**
	n	190	215	197
eIF5A	Coeficiente de Correlação	,686**	,529**	1
	n	195	197	228
RE	Coeficiente de Correlação	-0,009	,150*	-0,062
	n	230	215	228
RP	Coeficiente de Correlação	-,140*	0,07	-,151*
	n	230	214	227
HER2	Coeficiente de Correlação	-0,036	0,123	0,083
	n	230	215	228

* - a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral); ** - a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

Posteriormente, as mesmas correlações foram analisadas de forma específica por subgrupo molecular. Nas pacientes classificadas como Luminal A, o fator de tradução eIF4E se correlacionou de forma positiva e forte com os marcadores eIF4G e eIF5A ($R = 0,76$ e $R = 0,72$, respectivamente), destacado em turquesa na Tabela 10. O mesmo é observado com eIF5A, que também se correlacionou com eIF4E e eIF4G ($R = 0,72$ e $R = 0,70$, respectivamente), destacado em turquesa na mesma tabela. É interessante observar que os índices de correlação para este subgrupo molecular são mais altos que os observados quando a população total é avaliada. Estes resultados sugerem que, principalmente em tumores mamários mais diferenciados e de melhor prognóstico, como os luminais A, com alta expressão de

receptores hormonais, existe uma correlação geral entre os fatores de tradução, ou seja, a expressão de eIF4E, eIF4G e eIF5A está modulada de forma proporcional e conjunta.

Nos tumores classificados como Luminal B, também existe uma associação positiva entre os fatores de tradução. Este subgrupo molecular é composto com tumores menos diferenciados, com redução na expressão de RP e/ou com índices proliferativos mais elevados, o que resulta em piores prognósticos. eIF4E também se correlacionou de forma positiva e forte com os marcadores eIF4G e eIF5A ($R = 0,74$ e $R = 0,68$, respectivamente), destacado em rosa na **Tabela 10**. O mesmo é observado com eIF5A, que se correlacionou com eIF4E e eIF4G ($R = 0,68$ e $R = 0,63$, respectivamente), destacado em rosa na mesma tabela. É interessante destacar que neste grupo, as correlações são as mesmas encontradas no grupo luminal A, entretanto o nível de correlação é levemente mais baixo.

Já os tumores classificados como HER2 apresentam um padrão diferente entre os fatores de tradução aqui estudados. Neste grupo, igualmente aos tumores luminais, nenhum dos fatores de tradução se correlacionou com proliferação celular via Ki67 ou índice mitótico. Além disso, destacado em amarelo na **Tabela 10**, o fator eIF4E se correlaciona com eIF4G ($R = 0,80$) e o fator eIF4G se correlaciona com eIF5A ($R = 0,52$), igualmente os tumores luminais. Entretanto, particularmente neste grupo, a correlação entre os fatores eIF4E e eIF5A não é mais identificada. Além disso, entre todos os grupos observados, os tumores classificados como HER2 são os que apresentam a correlação positiva mais forte entre eIF4E e eIF4G.

Estas observações neste grupo podem ser explicadas pela biologia do tumor e impacto da amplificação no número de cópias do gene *HER2*. As vias de sinalização

que se tornam majoritariamente super ativas com o aumento dos receptores HER2 na membrana celular são: PI3K -> AKT -> mTOR (sobrevivência celular) e RAS -> RAF -> MEK -> ERK (proliferação celular). Estas vias de sinalização culminam no aumento da transcrição de genes alvo. Assim, é possível inferir que o excesso de mRNAs neste grupo gerados pela amplificação de *HER2* apresentem tradução dependente de *cap*, ou seja, dependente da formação do complexo de tradução eIF4F, que é composto por eIF4E e eIF4G, justificando a correlação positiva tão forte neste grupo. Além disso, o fator eIF5A é classicamente envolvido na literatura com a tradução de mRNAs específicos (facilitador na tradução de resíduos de poli prolina). Assim, neste grupo, a correlação entre eIF5A e eIF4G poderia ser um indício da existência de uma população de mRNAs traduzidos via IRES, ou seja, de forma independente de *cap*, uma vez que esta modalidade de tradução requer eIF4G, porém não é dependente de eIF4E.

Surpreendentemente, ao analisar-se as correlações dos fatores nas amostras classificadas como Triplo Negativo, o fator de tradução eIF4G perdeu todas as correlações com os demais componentes da maquinaria de tradução, assim como não se relacionou com nenhum biomarcador utilizado na rotina clínica. Já o fator eIF4E se relaciona com eIF5A ($R = 0,48$), o que está destacado em **vermelho** na **Tabela 10**. Este panorama sugere uma possível hipótese de que os fatores eIF4E e eIF5A têm alguma função singular nos tumores mais desdiferenciados, que já não expressam receptores hormonais e estão relacionados com pior prognóstico, como o subgrupo triplo negativo.

É interessante observar que eIF4E, eIF4G e eIF5A se correlacionaram de forma positiva somente nos tumores luminais. Já os tumores que superexpressam

HER2 não mantém o padrão luminal, uma vez que eIF4E e eIF5A não se relacionam mais. Porém, no grupo triplo negativo somente os fatores eIF4E e eIF5A se correlacionam. Portanto, estes resultados sugerem uma hipótese na qual, a tradução se comporta de forma diferente entre os grupos moleculares no câncer de mama. Além disso, nos tumores luminais, estes fatores atuam de forma global na maquinaria de tradução, ao passo que em amostras menos diferenciadas citologicamente, eIF4E e eIF5A podem estar atuando em conjunto na tradução diferencial de uma população de mRNAs, os quais podem contribuir com algum evento celular específico. Todas as associações mencionadas, categorizadas por subgrupo molecular, estão ilustradas na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Correlação entre a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A com os principais biomarcadores no câncer de mama (análise estatística calculada por meio do coeficiente r_s de Spearman) categorizados por subgrupo molecular.

Subgrupo molecular	rô de Spearman	eIF4E	eIF4G	eIF5A	RE	RP	HER2	Ki67	Índice mitótico
Luminal A	eIF4E	Coeficiente de correlação	,759**	,725**	0,151	0,147	-0,142	-0,025	0,048
		n	85	92	102	101	102	89	101
	eIF4G	Coeficiente de correlação		,707**	,266**	,267**	-0,033	-0,091	0,015
		n		91	96	95	96	86	95
	eIF5A	Coeficiente de correlação			0,006	0,115	-0,132	-0,002	-0,008
		n			107	106	107	97	105
Luminal B	eIF4E	Coeficiente de correlação	,736**	,681**	0,016	-0,133	-0,002	-0,203	-0,032
		n	60	58	78	79	78	59	77
	eIF4G	Coeficiente de correlação		,628**	-0,168	0,004	0,069	-0,013	0,155
		n		57	64	64	64	55	63
	eIF5A	Coeficiente de correlação			0,062	0,119	0,117	0,017	0,05
		n			67	67	67	58	66
HER2	eIF4E	Coeficiente de correlação	,806**	0,251			-0,132	0,157	0,201
		n	16	19	19	19	19	16	19
	eIF4G	Coeficiente de correlação		,525*			0,105	0,148	0,182
		n		18	19	19	19	17	19
	eIF5A	Coeficiente de correlação					0,421	-0,031	0,174
		n			21	21	21	18	21
Tripló-Negativo	eIF4E	Coeficiente de correlação	0,128	,480*			0,074	,531**	,540**
		n	29	26	31	31	31	27	31
	eIF4G	Coeficiente de correlação		-0,155			0,163	-0,174	0,207
		n		31	36	36	36	29	36
	eIF5A	Coeficiente de correlação					-0,08	,681**	0,305
		n			33	33	33	27	32

* - a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral); ** - a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

3.3.2.3 Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A na proliferação celular no câncer de mama

Baseando-se na hipótese sugerida acima, os fatores de tradução estudados estariam relacionados com o grau de diferenciação celular em algum nível e, conseqüentemente, com as taxas proliferativas do tumor. É interessante observar que a relação entre eIF4E, eIF4G e eIF5A e marcadores de proliferação celular como Ki67 e índice mitótico, muda dependendo do tipo molecular nos tumores mamários. Estes resultados foram apresentados somente **Tabela 10** acima, porém, devido ao grau de importância destes achados para o projeto, decidiu-se, para melhor compreensão do leitor, prover uma análise separada em maior profundidade.

Considerando-se todas as amostras envolvidas neste objetivo (n=278), o único fator que se correlacionou com o biomarcador para proliferação celular Ki67 foi o fator eIF5A (R = 0,24), destacado na **Tabela 11**. É uma correlação fraca, entretanto, este fator de tradução tem sido amplamente relacionado com proliferação e progressão celular (CRACCHIOLO et al. 2004; YANG et al. 2009).

Tabela 11 - Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a expressão do biomarcador para proliferação celular Ki67.

Variável	rô de Spearman	Ki67	eIF4E	eIF4G	eIF5A
Ki67	Coefficiente de Correlação	1	0,127	0,023	,238**
	n	228	191	187	200

** - a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

Concomitantemente, é interessante que estas análises sejam realizadas também com o Índice Mitótico. Existe uma tendência, mesmo que fraca, dos fatores eIF4E e eIF5A se relacionarem com IM. Entretanto, o fator eIF4G não apresentou

nenhuma tendência de correlação com os dois marcadores de proliferação aqui apresentados: Ki67 e IM. Este achado pode sugerir que a expressão deste fator não tem uma relevância celular para tradução específica de mRNAs relacionados à proliferação celular. As correlações entre os fatores de tradução e IM estão re-apresentadas na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a determinação do índice mitótico.

Variável	rô de Spearman	Índice mitótico	eIF4E	eIF4G	eIF5A
Índice mitótico	Coefficiente de Correlação	1	,151*	0,064	,163*
	N	271	228	213	224

* - a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral);

Uma vez identificada uma possível correlação fraca e ainda genérica entre os fatores de tradução eIF4E e eIF5A com os marcadores para proliferação celular (Ki67 e IM), é fundamental que esta análise seja categorizada, agora, nos subgrupos moleculares da doença. Primeiramente, foi revelado que os fatores eIF4E e eIF5A somente se correlacionavam com os marcadores de proliferação celular (Ki67) nos tumores classificados como triplo negativos. Ao categorizar-se os resultados nos grupos moleculares, eIF4E revelou uma correlação positiva e moderada com Ki67 somente nos tumores triplo negativos ($R = 0,53$), o que está destacado em amarelo na **Tabela 13**. Concomitante, o fator eIF5A que antes apresentava uma correlação positiva e fraca com Ki67 ($R = 0,24$ – **Tabela 11**), agora passa a ter uma correlação positiva e muito mais forte ($R = 0,68$ – destacado em amarelo na **Tabela 13**), também somente nos tumores triplo negativos. Este resultado, reforça a hipótese que o aumento da expressão destes fatores pode estar relacionada com a tradução de

um grupo de mRNAs mais envolvidos com tumores não luminais, menos diferenciados, com índices proliferativos maiores e, conseqüentemente, com tumores mamários de pior prognóstico. Além disso, é importante destacar que o fator eIF4G não se correlaciona com Ki67 em nenhum grupo molecular.

Interessantemente, os três fatores têm expressão correlacionada em conjunto no grupo luminal, ou seja, eIF4E correlaciona-se com eIF4G e eIF5A e, também, eIF4G correlaciona-se com eIF5A, porém sem correlação com marcadores de proliferação celular, como Ki67 e índice mitótico. Esta observação coloca eIF4E, eIF4G e eIF5A num cenário de tradução global, ou seja, sem algum impacto específico na tradução diferencial que pudesse resultar no aumento da proliferação celular, reforçando que o aumento do processo traducional estaria contribuindo para o aumento do fenótipo proteico de todos os eventos celulares de forma geral, sem predileção para alguma via específica. Além disso, este resultado sugere, conforme mencionado acima, que o início do processo tumorigênico satura a maquinaria de tradução, uma vez que o tumor necessita de um quantitativo proteico superior que uma célula normal para diversos processos celulares. Por esta razão, estes fatores-chave na tradução têm sua quantidade celular aumentada de forma conjunta. Porém, nos tumores não luminais (triplo negativos), somente os fatores eIF4E e eIF5A se correlacionam de forma positiva, sugerindo que estes dois últimos fatores podem estar relacionados com proliferação celular e pior prognóstico. Estas correlações estão apresentadas na **Tabela 13**.

Relembrando os resultados apresentados no capítulo 2, foi identificada uma relação entre taxas traducionais maiores e melhores prognósticos. Além disso, tumores luminais apresentam taxas de tradução superiores aos tumores não luminais

e índices mitóticos mais baixos. Ou seja, é possível traçar um paralelo com os resultados apresentandos acima. Aqui, é ilustrado que os fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A correlacionam-se entre si nos tumores luminais e nenhum deles se correlaciona com variáveis que traduzem proliferação celular (Ki67 ou índice mitótico). Portanto, esta observação corrobora que em tumores luminais, com células mais diferenciadas, a tradução celular aumenta de forma conjunta e global não dando preferência a tradução de populações de mRNAs associados a algum evento celular específico, como proliferação. Esta hipótese tem como fundamento o exposto até o momento acerca das correlações já descritas entre eIF4E e proliferação celular, assim como os indícios recentes que eIF5A atua de forma preferencial, favorecendo a tradução específica de uma subpopulação de mRNAs.

Tabela 13 - Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a expressão do biomarcador para proliferação celular Ki67, agora categorizada por subgrupo molecular da doença.

Subgrupo molecular	rô de Spearman		Ki67	eIF4E	eIF4G	eIF5A
Luminal A	Ki67	Coefficiente de correlação	1	-0,025	-0,091	-0,002
		n	109	89	86	97
Luminal B	Ki67	Coefficiente de correlação	1	-0,203	-0,013	0,017
		n	67	59	55	58
HER2	Ki67	Coefficiente de correlação	1	0,157	0,148	-0,031
		n	19	16	17	18
Triplo Negativo	Ki67	Coefficiente de correlação	1	,531**	-0,174	,681**
		n	33	27	29	27

* - a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral); ** - a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

Finalmente, foram feitas correlações entre os fatores de tradução de eIF4E, eIF4G e eIF5A com o Índice Mitótico. De forma congruente com a hipótese proposta, o fator eIF4E apresentou uma correlação positiva com IM somente no grupo classificado como triplo negativo ($R=0,54$), destacado em verde na Tabela 14. Este resultado é interessante, pois ecoa com a correlação deste fator com o biomarcador Ki67 também no mesmo subgrupo molecular. Estes resultados sinônimos entre os marcados Ki67 e IM reforçam que eIF4E, juntamente com eIF5A, possui um papel mais importante na proliferação celular de carcinomas mamários do tipo triplo negativo. Com estas observações é possível sugerir uma associação entre um aumento de expressão positiva e concomitante de eIF5A e eIF4E, sem estar em associação com eIF4G, com um pior prognóstico, por serem relevantes na tradução de grupos de mRNAs associados a um aumento na proliferação celular e tumores de menor grau de diferenciação. Estas informações foram organizadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise da correlação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a determinação do índice mitótico, agora categorizada por subgrupo molecular da doença.

Subgrupo molecular	rô de Spearman		Índice mitótico	eIF4E	eIF4G	eIF5A
Luminal A	Índice mitótico	Coefficiente de correlação	1	0,048	0,015	-0,008
		n	121	101	95	105
Luminal B	Índice mitótico	Coefficiente de correlação	1	-0,032	0,155	0,05
		n	89	77	63	66
HER2	Índice mitótico	Coefficiente de correlação	1	0,201	0,182	0,174
		n	22	19	19	21
Triplo Negativo	Índice mitótico	Coefficiente de correlação	1	0,540**	0,207	0,305
		n	39	31	36	32

* - a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral); ** - a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

Novamente, é fundamental mencionar os resultados apresentados no final do capítulo 2 desta tese. Ao passo que os tumores luminais apresentaram taxas de tradução maiores e índices proliferativos menores, os tumores classificados como triplo negativos se comportavam diferente. Estes tumores apresentam taxas de tradução menores, entretanto índices proliferativos muito mais altos, sugerindo que a tradução poderia estar envolvida favorecendo este processo celular especificamente.

Também, os resultados sumarizados nas **Tabelas 13 e 14** mostram, em uma nova casuística, que os tumores triplo negativos foram os únicos que apresentaram uma conexão entre tradução e proliferação celular. As taxas de tradução menores, associadas a índices proliferativos maiores e pior prognóstico, podem ser reflexo da atuação específica e conjunta de alguns componentes chave da maquinaria de tradução com algum fenômeno celular. Assim, estes tumores foram os únicos que apresentaram uma correlação singular entre eIF4E e eIF5A com proliferação celular (via Ki67 e índice mitótico), sugerindo que atuação destes fatores de forma sinérgica e não global, pode ser responsável por direcionar a tradução do global para o específico.

Portanto, é possível a proposição de uma hipótese mais robusta e elaborada com os resultados apresentados neste e no capítulo anterior, considerando que foram obtidos em populações diferentes. Foi observado que razões maiores entre índice mitótico/taxa de tradução e taxas de tradução mais baixas são relacionados com pior prognóstico e ambas variáveis também são características reveladas nos tumores classificados como triplo negativos. Paralelamente, somente este mesmo grupo apresenta uma correlação única entre eIF5A e eIF4E (sem relação com eIF4G) com índices proliferativos. Esta informação sugere um possível papel destes fatores na

tradução específica de mRNAs associados a proliferação celular em tumores triplo negativos.

3.3.2.4 Análise da relação entre os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A no grau de diferenciação celular e incidência de necrose no câncer de mama

Seguindo a hipótese proposta, foi analisada a correlação das expressões dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com as variáveis Grau Histológico e Necrose nos tumores de mama aqui estudados. O grau histológico, conforme descrito anteriormente, baseia-se na somatória dos escores de três fatores histológicos: a formação de túbulos e glândulas (maioria do tumor (> 75%); quantidade moderada (10-75%); pouca ou nenhuma (< 10%), o pleomorfismo nuclear (células pequenas, regulares e uniformes; variação moderada do tamanho do núcleo e marcada variação com a presença de nucléolos proeminentes) e a contagem mitótica em 10 campos de grande aumento (essa, dependente da área de campo microscópico). Um sistema de escore numérico de 1 a 3 é utilizado para cada fator independentemente. A somatória dos três valores atribuídos para cada fator varia de 3 a 9, correspondendo finalmente ao grau histológico, assim designado: 3-5 pontos (grau 1, bem diferenciado); 6-7 pontos (grau 2, moderadamente diferenciado) e 8-9 pontos (grau 3, pouco diferenciado). Portanto, é possível, também, relacionar esta variável com o grau de diferenciação celular e, conseqüentemente, agressividade do tumor.

A **Tabela 15** ilustra com clareza uma associação positiva e estatisticamente significativa entre um aumento na expressão dos fatores eIF4E e eIF5A com graus histológicos maiores. É possível observar que o aumento na expressão de eIF4E está em linha com o aumento do valor atribuído ao grau histológico das pacientes

($p < 0,05$), assim como com o fator eIF5A ($p < 0,01$). Estes resultados contribuem com a hipótese em construção até este momento, pois mais um resultado indica que o aumento conjunto da expressão destes fatores, quando não correlacionados com eIF4G, está relacionado com um menor grau de diferenciação celular. Portanto, altas expressões destes fatores (eIF4E e eIF5A) poderiam estar associadas com pior prognóstico e um crescimento tumoral mais acelerado, como foi visto que nos tumores Triplo-Negativos existe uma associação com o marcador Ki67. Interessantemente, o fator eIF4G não atingiu alguma diferença com significância estatística na comparação entre os diferentes graus histológicos (1, 2 ou 3), o que vai de encontro aos resultados obtidos anteriormente, que excluem uma possível associação deste fator com o grau de diferenciação celular e uma assinatura genética de pior prognóstico com presença de taxas proliferativas superiores.

Tabela 15 - Análise dos diferentes grupos da variável Grau Histológico (1, 2 ou 3) com a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A. É possível observar que existe uma diferença significativa nos fatores eIF4E e eIF5A com um intervalo de confiança de 95%.

	Grau histológico	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	1	46	120,29	160,9	154,35	216,4	26,76		< 0,05
	2	107	119,34	163,38	160,37	221,33	22,63		
	3	77	117,84	168,86	168,07	217,32	21,93		
	Total	230	117,84	164,72	161,96	221,33	23,38		
eIF4G	1	35	128,89	158,6	154,75	207,37	19,31	Teste não paramétrico para amostras independentes: Kruskal-Wallis	0,17
	2	106	112,74	156,77	153,39	206,43	19,83		
	3	74	72,91	161,21	165,73	210,89	29,4		
	Total	215	72,91	158,6	156,46	210,89	23,48		
eIF5A	1	40	109,88	149,19	144,56	194,74	19,41		< 0,01
	2	113	118,08	151,57	149,27	212,03	19,99		
	3	73	121,33	160,59	158,07	225,5	22,26		
	Total	226	109,88	154,06	150,64	225,5	21,07		

Já a variável Necrose Tumoral, pode ser relacionada com um crescimento do câncer em ritmo acelerado, correlacionando-se com índices proliferativos maiores e, particularmente no câncer de mama, mais incidente em pacientes classificadas como triplo-negativas. Esta correlação ocorre justamente por este subgrupo molecular apresentar índices mitóticos mais altos e tumores, de uma maneira geral, maiores, em tamanho (cm), ao diagnóstico. Estas informações são descritas na literatura (PAL et al 2011) e, também, foram identificadas neste trabalho, como foi observado na **Tabela 7**. Por estes motivos, é interessante avaliar a correlação das expressões proteicas dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A com a presença ou ausência de necrose no tumor. O panorama identificado nestas análises corrobora a hipótese elaborada com este trabalho, ou seja, espera-se que um aumento na expressão dos fatores eIF4E e eIF5A esteja relacionada com uma maior incidência na presença de necrose tumoral, uma vez que estes fatores foram correlacionados, até agora, com índices proliferativos mais altos (índice mitótico e Ki67) e com graus de diferenciação celular menores (maior expressão no subgrupo triplo-negativo e relação com aumento no grau histológico).

Os resultados advindos desta análise corroboram de forma positiva a hipótese proposta. Como esperado pelo panorama identificado até o momento, o aumento da expressão do fator eIF4E está associado com uma maior incidência de necrose identificada no tumor ($p < 0,05$), assim como o fator eIF5A ($p < 0,05$), entretanto não com o fator eIF4G (**Tabela 16**). Estes achados ecoam não somente com a hipótese construída neste capítulo, como também com o cenário clínico esperado, o que torna a conjectura proposta mais sólida. Até o momento ambos foram relacionados com tumores não luminiais (principalmente o subgrupo molecular triplo negativo), com

maiores taxas de proliferação (conforme associação com Ki67 e IM) e com grau de diferenciação celular (sugerido pela variável grau histológico).

Tabela 16 - Análise dos diferentes grupos da variável Necrose Tumoral (ausente ou presente) com a expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A. É possível observar que existe uma diferença significativa nos fatores eIF4E e eIF5A com um intervalo de confiança de 95%.

	Necrose	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	Ausente	181	117,84	162,94	158,86	221,33	23,8	Teste para amostras independentes: teste-t para igualdade de médias	< 0,05
	Presente	46	122,08	171,95	170,65	212,29	22,32		
	Total	227	117,84	164,77	161,81	221,33	23,74		
eIF4G	Ausente	164	107,2	157,74	155,27	207,65	20		0,33
	Presente	46	72,91	162,53	166,27	210,89	31,46		
	Total	210	72,91	158,79	156,33	210,89	23		
eIF5A	Ausente	176	109,88	151,84	149,49	212,03	20,21		< 0,05
	Presente	47	128,12	159,73	158,07	225,5	21,69		
	Total	223	109,88	153,51	150,17	225,5	20,73		

Portanto, os resultados encontrados até agora permitem sugerir que o aumento da expressão dos fatores eIF4E e eIF5A de forma concomitante e desvinculada de eIF4G está associado com uma possível assinatura de pior prognóstico, principalmente para os tumores não luminais, particularmente os classificados como triplo negativos. Além disso, estes fatores podem ser testados na clínica para uma possível relevância no diagnóstico, determinação do prognóstico da paciente e como alvos drogáveis para futuras novas moléculas, como resultado da medicina translacional e foco na terapia personalizada em grupos ainda tratados com quimioterapia citotóxica.

3.3.2.5 Análise da sobrevida (livre de doença e câncer-específica) levando-se em consideração a baixa e alta expressão dos fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A

Uma vez identificada uma relação coerente entre as expressões dos fatores de tradução aqui estudados e diversos parâmetros clínicos e moleculares, os quais predizem o comportamento clínico do câncer de mama, foi avaliado o impacto da expressão diferencial de eIF4E, eIF4G e eIF5A na sobrevida livre de doença (SLD) e câncer-específica (SCE) das pacientes. Conforme apresentado e discutido neste capítulo, os fatores eIF4E e eIF5A foram correlacionados com fatores de pior prognóstico para a doença, como menor grau de diferenciação celular, subtipos moleculares mais agressivos (triplo-negativo) e com índices proliferativos maiores. Assim, espera-se observar que pacientes com maior expressão destes fatores apresentem uma diferença negativa na sobrevida observada.

Para isto, conforme descrito na metodologia estatística deste capítulo, foram determinados pontos de corte para a expressão (determinada por IHQ) dos fatores de tradução estudados, os quais permitem a categorização das pacientes em alta ou baixa expressão para cada um destes marcadores. Vale a pena ressaltar que os modelos e algoritmos estatísticos utilizados nesta determinação foram aplicados pelo Dr. Vinicius Fernando Calsavara, do Núcleo de Epidemiologia e Estatística da instituição. Assim, foi possível a determinação do ponto de corte, considerando as expressões de cada proteína em valores numéricos que são traduzidos pelo HScore, o qual foi calculado conforme mencionado na metodologia deste capítulo.

Após a realização do teste de maximização dos pontos de corte para todos os fatores de tradução com relação a recorrência, foram realizadas as curvas de sobrevida livre de doença utilizando o método de Kaplan-Meier. Para o fator eIF4E

foi determinado um ponto de corte no valor de 140, ou seja, amostras tumorais que apresentassem expressões deste fator acima de 140 foram consideradas como pacientes de alta expressão e abaixo de 140 de baixa expressão. O mesmo foi feito para o fator eIF4G, com o valor de corte de 126 e para o fator eIF5A com o valor de corte de 159,5.

A **Figura 23** ilustra as curvas de SLD determinadas para os fatores eIF4E, eIF4G e eIF5A. Foi somente observada alguma diferença estatisticamente significativa na curva relacionada a expressão diferencial do fator eIF4E ($p < 0,05$). Este resultado sugere que pacientes que apresentam uma expressão aumentada do fator eIF4E no tumor primário, apresentam uma maior probabilidade de recidiva da doença em comparação às pacientes do grupo de baixa expressão para este fator. Este fator está classicamente envolvido com proliferação celular, com resultados descritos na literatura, conforme apresentados na introdução desta tese, assim como os resultados identificados neste trabalho. Portanto, é possível inferir que exista uma correlação entre um aumento da expressão deste fator com uma maior possibilidade de recidiva da doença. Já os marcadores eIF4G e eIF5A não apresentaram resultados significantes em relação a recidiva da patologia.

Também foi feita a realização do teste de maximização dos pontos de corte para todos os fatores de tradução com relação ao óbito, foram realizadas as curvas de sobrevida câncer-específica utilizando o método de Kaplan-Mayer. Para o fator eIF4E foi determinado um ponto de corte no valor de 156, ou seja, amostras tumorais que apresentassem expressões deste fator acima de 156 foram consideradas como pacientes de alta expressão e abaixo de 156 de baixa expressão. O mesmo foi feito para o fator eIF4G, com o valor de corte de 151 e para o fator eIF5A com o valor de

corde de 144.

Interessantemente, ao se analisar a SCE, conforme esperado, eIF4E e eIF5A atuam como fatores de pior prognóstico, o que pode ser observado com curvas de sobrevida piores e com relevância estatística, o que pode ser observado na **Figura 24**. Estes fatores foram relacionados com diversos aspectos clínicos de pior prognóstico, como índices proliferativos maiores (Ki67 e IM), graus histológicos maiores, redução na expressão de RP, maior presença de necrose e uma correlação positiva em subtipos moleculares mais agressivos, como o triplo negativo. Desta forma, faz sentido biológico identificar que estes fatores também atuem como marcadores de pior prognóstico para o câncer de mama, o que é revelado com as curvas de SCE. Também, o fator eIF4G não apresenta relevância estatística nesta análise.

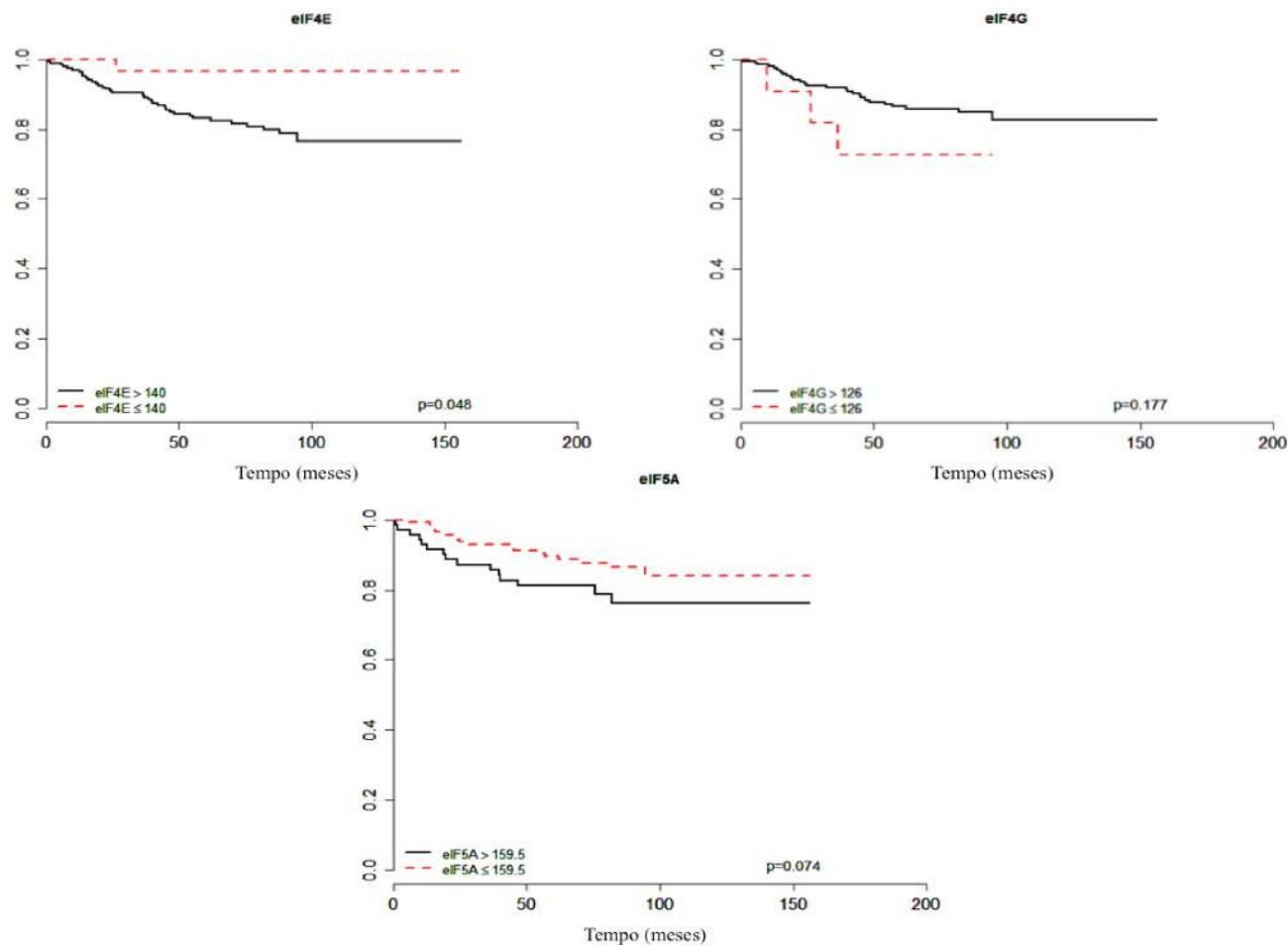


Figura 23 - Curvas de sobrevida livre de doença (SLD) para os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A. (eIF4E: ponto de corte de 140 ($p = 0,05$); eIF4G: ponto de corte de 126 ($p = 0,17$); eIF5A: ponto de corte de 159,5 ($p = 0,07$)).

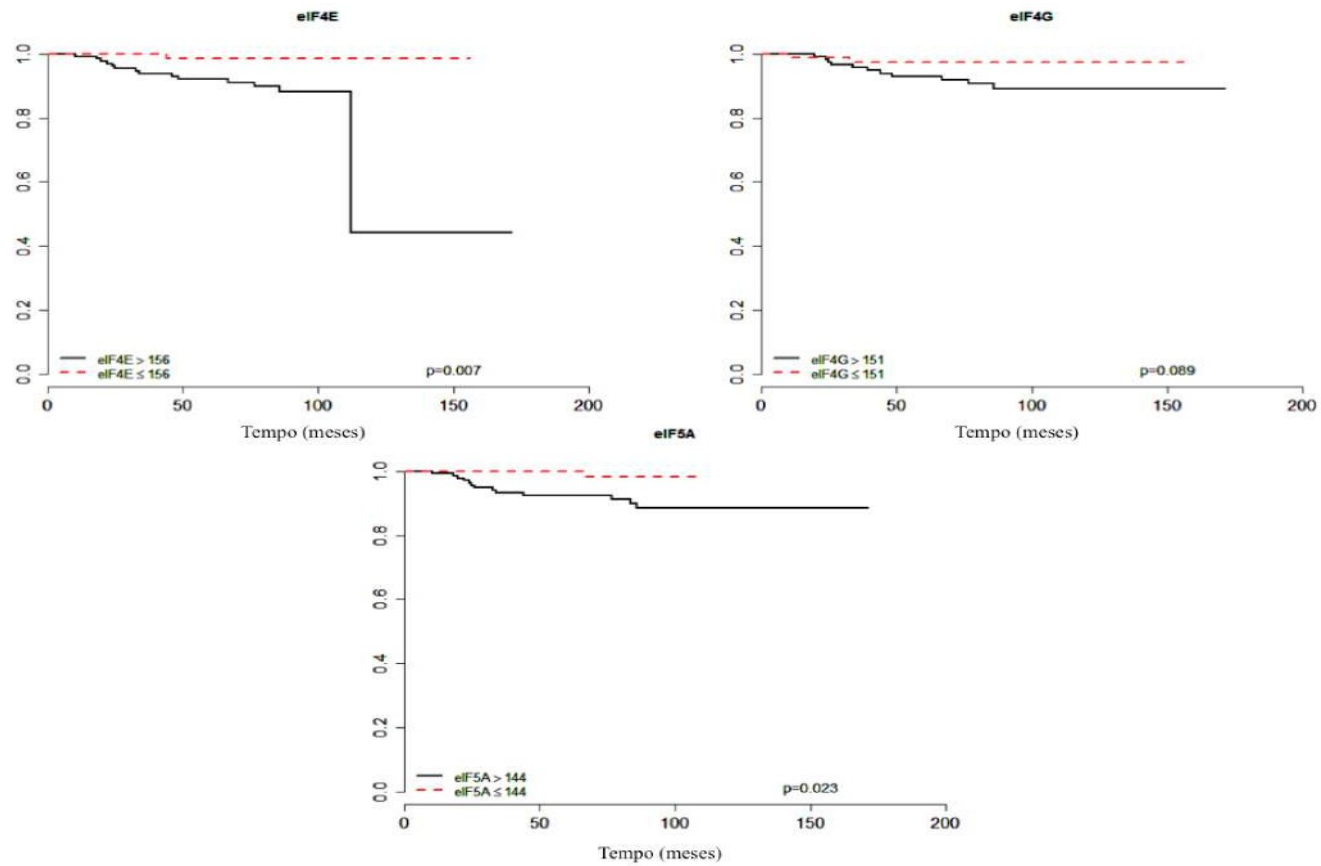


Figura 24 - Curvas de sobrevida câncer específica (SCE) para os fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A. (eIF4E: ponto de corte de 156 ($p = 0,01$); eIF4G: ponto de corte de 151 ($p = 0,09$); eIF5A: ponto de corte de 144 ($p = 0,02$)).

Portanto, levando-se em consideração todos os resultados apresentados neste capítulo, é possível estabelecer uma hipótese robusta acerca do reflexo da expressão diferencial dos fatores de tradução eIF4E, eIF4G e eIF5A no câncer de mama. Os três fatores apresentam uma correlação positiva e significativa em tumores mamários mais diferenciados e de bom prognóstico (Luminais), indicando que existe um aumento nos componentes gerais da maquinaria de tradução, pois a célula tumoral necessita de uma maior aporte proteico a fim de suprir os resultados de acúmulo de mutações e descontrole de processos celulares vitais, como o ciclo celular. Entretanto, a medida que observamos o comportamento destes fatores, foi possível identificar que somente eIF4E e eIF5A estão relacionados com graus de diferenciação menores e maiores índices proliferativos. Este resultado também é corroborado pelo fato de eIF4G perder a correlação com os demais fatores no subgrupo molecular triplo-negativo, o que não ocorre nos tumores luminais. Finalmente, tumores com alta expressão para eIF4E e eIF5A estão, de fato, relacionados com um pior prognóstico, o que é traduzido nas curvas de sobrevida câncer-específica. Portanto, é de grande importância para uma melhor compreensão da biologia tumoral, a determinação das populações de mRNAs preferencialmente traduzidas no aumento da expressão proteica destes componentes da máquina de tradução no câncer de mama. Além disso, é importante destacar que novos estudos podem reforçar a possibilidade de eIF4E e eIF5A serem alvos possivelmente interessantes para futuras terapias-alvo, principalmente para o subgrupo molecular triplo-negativo, o qual é ainda tratado majoritariamente por esquemas quimioterápicos citotóxicos muito agressivos.

4 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como foco ampliar a relevância do controle traducional na melhor compreensão da biologia tumoral no câncer de mama.

Este aspecto foi abordado inicialmente com o desenvolvimento de uma metodologia experimental que permitisse a aplicação da translatômica, por meio da adaptação de um novo gradiente para aperfeiçoamento da técnica de perfil polissomal, em amostras de tecido humano. Uma vez estabelecido este novo protocolo, o mesmo pode ser aplicado em um conjunto de tecidos de carcinomas mamários congelados, os quais foram fornecidos pelo BioBanco do A.C. Camargo Cancer Center.

Como pode ser observado no primeiro capítulo da seção 3 (Resultados e Discussão), o qual foi apresentado na forma de manuscrito já publicado (LIANG et al. 2017), um novo gradiente foi determinado para utilização em técnicas de perfil polissomal. O desenvolvimento de um gradiente não-linear permite que o fracionamento gravitacional acumule os polissomos mais pesados em um número menor de frações a serem coletadas. Este ponto é fundamental para que, metodologicamente, a extração de mRNAs associados a polissomos (RNA polissomal) seja otimizada. Tal modificação é crucial para análises de translatômica em amostras de tecido humano congelados, pois, de uma forma geral, são amostras muito pequenas e que fornecem uma quantidade reduzida de macromoléculas. Também, foram comparados os resultados de expressão gênica em gradientes lineares e não-lineares, sem a identificação de alterações significativas. Portanto,

conclui-se com este primeiro capítulo que o gradiente não-linear desenvolvido é de grande relevância, pois permite a futura aplicação da translátômica em outras patologias e amostras de tecido humano congelado e armazenado em biobancos.

Além disso, após fracionamento celular por meio de perfil polissomal, as amostras puderam ser transformadas em bibliotecas para determinação de novos padrões de expressão gênica, os quais encontram-se em análise no laboratório do colaborador, Dr. Ola Larsson (Karolinska Institutet – Estocolmo), para futuras publicações. Finalmente, o controle da maquinaria de tradução em tumores mamários foi abordado com a análise da expressão proteica de componentes-chave neste processo. Assim, esta tese amplia os horizontes para estudos de translátômica em tecidos congelados provenientes de biobancos, fornece, de forma inédita, a possibilidade da aplicação da translátômica em tecidos humanos de carcinoma mamário e analisa o impacto da expressão diferencial de fatores de tradução importantes na progressão e no prognóstico do câncer de mama.

Já o segundo capítulo ilustra a aplicação do perfil polissomal descrito acima em amostras do BioBanco desta instituição, com isolamento do RNA citosólico e polissomal e construção de bibliotecas. Esta etapa é de grande importância, porque contemplou a adaptação de uma metodologia denominada Smart-seq2, a qual foi inicialmente construída para sequenciamento de RNA advindo de células eucarióticas únicas, para o material isolado após o perfil polissomal. Entretanto, devido a alta complexidade na análise dos dados obtidos após o sequenciamento, os resultados de expressão gênica determinados por uma abordagem translátômica não são mostrados nesta tese, pois ainda se encontram em desenvolvimento no laboratório do colaborador. Desta forma, é possível observar a descrição

metodológica que permite o isolamento e sequenciamento do RNA polissomal desde a retirada do BioBanco até a biblioteca final pronta para que possa ser sequenciada.

Além disso, neste capítulo foi analisada a relação quantitativa da tradução nas células que compunham as amostras de tecido tumoral utilizadas com proliferação celular e prognóstico. Foi possível observar que tumores mais diferenciados, apresentam taxas de tradução maiores, melhor prognóstico e menor índice proliferativo. Ao mesmo tempo, tumores menos diferenciados, apresentam índices mitóticos maiores e taxas de tradução menores, sugerindo um maior comprometimento da maquinaria de tradução com proliferação celular. Assim, estes dados colocam a tradução específica como fator importante de pior prognóstico e tumores mamários mais proliferativos.

Por último, o terceiro capítulo desta seção descreve a escolha de três fatores de tradução fundamentais para a maquinaria deste processo: eIF4E, eIF4G e eIF5A. Foi possível observar que todos os fatores aumentam a expressão de forma conjunta em tumores luminais, que apresentam crescimento celular mais lento em comparação com outros grupos moleculares, como o triplo-negativo. Além disso, nenhum destes componentes da maquinaria de tradução se relaciona com proliferação celular (IM ou Ki67) no grupo luminal. Entretanto, os fatores eIF4E e eIF5A parecem atuar em conjunto em tumores mamários mais agressivos, como foi o caso das amostras classificadas como triplo-negativas, nas quais eIF4G perdeu a correlação com os outros fatores estudados. eIF4E e eIF5A apresentaram correlações positivas com Ki67, IM, presença de necrose, grau histológico e uma correlação negativa com o RP. Além disso, ao classificar as amostras em grupos luminais e não-luminais, eIF4G aumenta nos grupos luminais e eIF4E e eIF5A apresentam uma tendência de

aumento da expressão em grupos não-luminais. Finalmente, estes dois últimos fatores foram associados com um pior prognóstico ao analisar-se as curvas de sobrevida câncer-específica.

eIF4E é descrito na literatura como um proto-oncogene e que uma expressão aumenta deste fator está relacionada com processos tumorigênicos, inclusive no câncer de mama, porém foi a primeira vez que ele foi envolvido mais diretamente com tumores mamários menos diferenciados e de pior prognóstico. eIF5A também é envolvido com proliferação celular, entretanto este não existe evidência na literatura que correlaciona este fator com o câncer de mama, e este trabalho identificou uma relação deste fator como marcador de pior prognóstico e uma expressão aumentada também em tumores menos diferenciados. Este fato também abre espaço para possibilidade de novos estudos que correlacionem eIF4E e eIF5A como possíveis candidatos para terapias-alvo no câncer de mama triplo-negativo, o qual ainda é majoritariamente tratado com esquemas quimioterápicos inespecíficos e altamente citotóxicos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biol Res** 2017; 50:33.

Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. **Cell** 2006; 125:1125-36.

Alvarenga AW, Machado LE, Rodrigues BR, et al. Evaluation of Akt and RICTOR expression levels in astrocytomas of all grades. **J Histochem Cytochem** 2017; 65:93-103.

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.

Arps DP, Healy P, Zhao L, Kleer CG, Pang JC. Invasive ductal carcinoma with lobular features: a comparison study to invasive ductal and invasive lobular carcinomas of the breast. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 138:719-26.

Atkinson GC, Baldauf SL, Hauryliuk V. Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. **BMC Evol Biol** 2008; 8:290.

Avdulov S, Li S, Michalek V, et al. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. **Cancer Cell** 2004; 5:553-63.

Avdulov S, Herrera J, Smith K, et al. eIF4E threshold levels differ in governing normal and neoplastic expansion of mammary stem and luminal progenitor cells. **Cancer Res** 2015; 75:687-97.

Baird TD, Wek RC. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. **Adv Nutr** 2012; 3:307-21.

Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. **Nature** 2012; 486:405-9.

Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R, Ariza CB, de Oliveira CE, Watanabe MA. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Dis Markers** 2014; 2014:513158.

Bao Y, Lu Y, Wang X, et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A2 (eIF5A2) regulates chemoresistance in colorectal cancer through epithelial mesenchymal transition. **Cancer Cell Int** 2015; 15:109.

Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, et al. Whole- breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomized phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2015; 16:47-56.

Bellato HM, Hajj GN. Translational control by eIF2 α in neurons: Beyond the stress response. **Cytoskeleton (Hoboken)** 2016; 73:551-565.

Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. **Science** 2013; 339:1323-8.

Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. **JAMA** 2006; 295:1658-67.

Bhat M, Robichaud N, Hulea L, et al. Targeting the translation machinery in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery** 2015; 14:261-278.

Böcker W. [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. **Verh Dtsch Ges Pathol** 2002; 86:116-9.

Bower JJ, Vance LD, Psioda M, et al. Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. **NPJ Breast Cancer** 2017; 3:9.

Braunstein S, Karpisheva K, Pola C, et al. A hypoxia- controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. **Mol Cell** 2007; 28:501-12.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. **Nature** 2012; 490:61-70.

Carroll M, Borden KL. The oncogene eIF4E: using biochemical insights to target cancer. **J Interferon Cytokine Res** 2013; 33:227-38.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer** 1989; 63:181-7.

Cencic R, Carrier M, Galicia-Vázquez G, et al. Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol. **PLoS One** 2009; 4:e5223.

Chang J, Clark GM, Allred DC, et al. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. **Cancer** 2003; 97:545-53.

Chen J, Tsai A, O'Leary SE, Petrov A, Puglisi JD. Unraveling the dynamics of ribosome translocation. **Curr Opin Struct Biol** 2012; 22:804-14.

Chen L, Uchida K, Endler A, Shibasaki F. Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. **J Biol Chem** 2007; 282:12707-16.

Cigan AM, Feng L, Donahue TF. tRNAi(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. **Science** 1988; 242:93-7.

Clarke M, Coates AS, Darby SC, et al. Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. **Lancet** 2008; 371:29-40.

Cmarik JL, Min H, Hegamyer G, et al. Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:14037-42.

Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, et al. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. **Mol Cell** 2000; 5:597-605.

Cracchiolo BM, Heller DS, Clement PM, et al. Eukaryotic initiation factor 5A-1 (eIF5A-1) as a diagnostic marker for aberrant proliferation in intraepithelial neoplasia of the vulva. **Gynecol Oncol** 2004; 94:217-22.

Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. **Ann Oncol** 2017; 28:1700-12.

Darby S, McGale P, Correa C, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. **Lancet** 2011; 378:1707-16.

de la Parra C, Otero-Franqui E, Martinez-Montemayor M, Dharmawardhane S. The soy isoflavone equol may increase cancer malignancy via up-regulation of eukaryotic protein synthesis initiation factor eIF4G. **J Biol Chem** 2012; 287:41640-50.

Degen M, Barron P, Natarajan E, Widlund HR, Rheinwald JG. RSK activation of translation factor eIF4B drives abnormal increases of laminin γ 2 and MYC protein during neoplastic progression to squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2013; 8:e78979.

DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, et al. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2015; 24:1495-506.

Dever TE, Green R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a013706.

Dias CA, Gregio AP, Rossi D, et al. eIF5A interacts functionally with eEF2. **Amino Acids** 2012; 42:697-702.

Diehn M, Bhattacharya R, Botstein D, Brown PO. Genome-scale identification of membrane-associated human mRNAs. **PLoS Genet** 2006; 2:e11.

Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. **Science** 2013; 339:85-8.

Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, et al. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. **Science** 2006; 314:467-71.

Dyer J, Sossin WS. Characterization of the role of eIF4G in stimulating cap-and IRES-dependent translation in aplysia neurons. **PLoS One** 2013; 8:e74085.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. **Lancet** 2005; 365:1687-717.

Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. **Cancer Discov** 2013; 3:27-34.

Ellis MJ, Ding L, Shen D, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. **Nature** 2012; 486:353-60.

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** 2002; 41:154-61.

Fagan DH, Fettig LM, Avdulov S, et al. Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. **Horm Cancer** 2017; 8:219-229.

Fekete CA, Applefield DJ, Blakely SA, et al. The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection in vivo. **EMBO J** 2005; 24:3588-601.

Feoktistova K, Tuvshintogs E, Do A, Fraser CS. Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:13339-44.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 2010; 127:2893-917.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:966-78.

Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 159:257-63.

Fujimura K, Choi S, Wyse M, et al. Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. **J Biol Chem** 2015; 290:29907-19.

Gallagher JW, Kubica N, Kimball SR, Jefferson LS. Reduced eukaryotic initiation factor 2Bepsilon-subunit expression suppresses the transformed phenotype of cells overexpressing the protein. **Cancer Res** 2008; 68:8752-60.

Gao B, Roux PP. Translational control by oncogenic signaling pathways. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1849:753-65.

Gao YG, Selmer M, Dunham CM, et al. The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. **Science** 2009; 326:694-9.

Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2004; 5:827-35.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu Rev Biochem** 1999; 68:913-63.

Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. **Breast Care (Basel)** 2017; 12:102-7.

Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 380:785-90.

Grzmil M, Rzymiski T, Milani M, et al. An oncogenic role of eIF3e/INT6 in human breast cancer. **Oncogene** 2010; 29:4080-9.

Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. **Histopathology** 2003; 42:70-6.

Gutierrez E, Shin BS, Woolstenhulme CJ, et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Mol Cell** 2013; 51:35-45.

Haibe-Kains B, Desmedt C, Piette F, et al. Comparison of prognostic gene expression signatures for breast cancer. **BMC Genomics** 2008; 9:394.

Ham M, Moon A. Inflammatory and microenvironmental factors involved in breast cancer progression. **Arch Pharm Res** 2013; 36:1419-31.

Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Oncol Pract** 2010; 6:195-7.

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

Hinnebusch AG, Lorsch JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a011544.

Hinton TM, Coldwell MJ, Carpenter GA, Morley SJ, Pain VM. Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. **J Biol Chem** 2007; 282:1695-708.

Jackson RJ. The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5:a011569.

Jung SY, Rosenzweig M, Sereika SM, et al. Factors associated with mortality after breast cancer metastasis. **Cancer Causes Control** 2012; 23:103-12.

Kapp LD, Lorsch JR. The molecular mechanics of eukaryotic translation. **Annu Rev Biochem** 2004; 73:657-704.

Kemper WM, Berry KW, Merrick WC. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. **J Biol Chem** 1976; 251:5551-7.

Kim SR, Paik S. Genomics of adjuvant therapy for breast cancer. **Cancer J** 2011; 17:500-4.

Larsson O, Li S, Issaenko OA, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. **Cancer Res** 2007; 67:6814-24.

Larsson O, Nadon R. Gene expression - time to change point of view? **Biotechnol Genet Eng Rev** 2008; 25:77-92.

- Larsson O, Sonenberg N, Nadon R. Identification of differential translation in genome wide studies. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:21487-92.
- Larsson O, Sonenberg N, Nadon R. anota: Analysis of differential translation in genome-wide studies. **Bioinformatics** 2011; 27:1440-1.
- Larsson O, Tian B, Sonenberg N. Toward a genome-wide landscape of translational control. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5:a012302.
- Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.
- Liang S, Bellato HM, Lorent J, et al. Polysome-profiling in small tissue samples. **Nucleic Acids Res** 2017; Oct 23.
- Lohrisch C, Paltiel C, Gelmon K, et al. Impact on survival of time from definitive surgery to initiation of adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:4888-94.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochem J** 2012; 441:1-21.
- Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. **Genome Biol** 2003; 4:223.
- Martineau Y, Azar R, Müller D, et al. Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. **Oncogene** 2014; 33:1367-74.
- Martinez-Nunez RT, Sanford JR. Studying Isoform-Specific mRNA Recruitment to Polyribosomes with Frac-seq. **Methods Mol Biol** 2016; 1358:99-108.

Mathews MB, Hershey JW. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1849:836-44.

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

Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. **Nature** 2016; 534:55-62.

Mikulits W, Pradet-Balade B, Habermann B, et al. Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. **FASEB J** 2000; 14:1641-52.

Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. **Mod Pathol** 2002; 15:1366-73.

Mohammed H, Russell IA, Stark R, et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. **Nature** 2015; 523:313-7.

Morigi C. Highlights from the 15th St Gallen International Breast Cancer Conference 15-18 March, 2017, Vienna: tailored treatments for patients with early breast cancer. **Ecancermedicalsecience** 2017; 11:732.

Muggerud AA, Hallett M, Johnsen H, et al. Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. **Mol Oncol** 2010; 4:357-68.

Nakanishi S, Cleveland JL. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids** 2016; 48:2353-62.

Narod SA. Tumour size predicts long-term survival among women with lymph node-positive breast cancer. **Curr Oncol** 2012; 19:249-53.

Nasr Z, Robert F, Porco JA Jr, Muller WJ, Pelletier J. eIF4F suppression in breast cancer affects maintenance and progression. **Oncogene** 2013; 32:861-71.

Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed *HER2* in transformation. **Ann Oncol** 2001; 12:S9-13.

Ochnik AM, Peterson MS, Avdulov SV, et al. Amplified in breast cancer regulates transcription and translation in breast cancer Cells. **Neoplasia** 2016; 18:100-10.

Ojeda L, Gao J, Hooten KG, et al. Critical role of PI3K/Akt/GSK3 β in motoneuron specification from human neural stem cells in response to FGF2 and EGF. **PLoS One** 2011; 6:e23414.

Olin JL, St Pierre M. Aromatase inhibitors in breast cancer prevention. **Ann Pharmacother** 2014; 48:1605-10.

Olver I. Cancer control-A global perspective. **Eur J Cancer Care (Engl)** 2017; 26:e12654.

Özeş AR, Feoktistova K, Avanzino BC, Fraser CS. Duplex unwinding and ATPase activities of the DEAD-box helicase eIF4A are coupled by eIF4G and eIF4B. **J Mol Biol** 2011; 412:674-87.

Pal SK, Childs BH, Pegram M. Triple negative breast cancer: unmet medical needs. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 125:627-36.

Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, et al. mRNA helicases: the tacticians of translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2011; 12:235-45.

Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, et al. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. **Mol Cell** 2007; 26:41-50.

Pelechano V, Alepuz P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. **Nucleic Acids Res** 2017; 45:7326-38.

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

Pettersson F, Yau C, Dobocan MC, et al. Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. **Clin Cancer Res** 2011; 17:2874-84.

Piccirillo CA, Bjur E, Topisirovic I, Sonenberg N, Larsson O. Translational control of immune responses: from transcripts to translatoemes. **Nat Immunol** 2014; 15:503-11.

Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. **Nat Protoc** 2014; 9:171-81.

Pisarev AV, Unbehaun A, Hellen CU, Pestova TV. Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. **Methods Enzymol** 2007; 430:147-77.

Pons B, Peg V, Vázquez-Sánchez MA, et al. The effect of p-4E-BP1 and p-eIF4E on cell proliferation in a breast cancer model. **Int J Oncol** 2011; 39:1337-45.

Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. **Nat Med** 2009; 15:842-4.

Rafalski VA, Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. **Prog Neurobiol** 2011; 93:182-203.

Redondo N, García-Moreno M, Sanz MA, Carrasco L. Translation of viral mRNAs that do not require eIF4E is blocked by the inhibitor 4EGI-1. **Virology** 2013; 444:171-80.

Ren Z, Li Y, Shen T, et al. Prognostic factors in advanced breast cancer: Race and receptor status are significant after development of metastasis. **Pathol Res Pract** 2016; 212:24-30.

Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. **Am J Pathol** 2013; 183:1113-24.

Rodnina MV, Wintermeyer W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:435-43.

Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature** 2009; 459:118-21.

Schiffman SC, McMasters KM, Scoggins CR, Martin RC, Chagpar AB. Lymph node ratio: a proposed refinement of current axillary staging in breast cancer patients. **J Am Coll Surg** 2011; 213:45-52.

Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol** 2010; 23:S60-4.

Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature** 2012; 486:395-9.

Sherrill KW, Byrd MP, Van Eden ME, Lloyd RE. BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. **J Biol Chem** 2004; 279:29066-74.

Shima H, Pende M, Chen Y, et al. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. **EMBO J** 1998; 17:6649-59.

Siddiqui N, Sonenberg N. Signalling to eIF4E in cancer. **Biochem Soc Trans** 2015; 43:763-72.

Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:254-66.

Silvera D, Arju R, Darvishian F, et al. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. **Nat Cell Biol** 2009; 11:903-8.

Silvera D, Schneider RJ. Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia. **Cell Cycle** 2009; 8:3091-6.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against *HER2* for metastatic breast cancer that overexpresses *HER2*. **N Engl J Med** 2001; 344:783-92.

Smith RA, Manassaram-Baptiste D, Brooks D, Doroshenk M, Fedewa S, et al. Cancer screening in the United States, 2015: a review of current American cancer society guidelines and current issues in cancer screening. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:30-54.

Sorrells DL, Black DR, Meschonat C, Rhoads R, De Benedetti A, et al. Detection of eIF4E gene amplification in breast cancer by competitive PCR. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:232-7.

Spirin AS. How does a scanning ribosomal particle move along the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA? Brownian Ratchet model. **Biochemistry** 2009; 48:10688-92.

Stansfield I, Jones KM, Tuite MF. The end in sight: terminating translation in eukaryotes. **Trends Biochem Sci** 1995; 20:489-91.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. **Nature** 2012; 486:400-4.

Stitzel NO, Mar BG, Liang J, Westbrook CA. Membrane-associated and secreted genes in breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:8682-7.

Sunavala-Dossabhoy G, Fowler M, De Benedetti A. Translation of the radioresistance kinase TLK1B is induced by gamma-irradiation through activation of mTOR and phosphorylation of 4E-BP1. **BMC Mol Biol** 2004; 5:1.

Sung JS, Jochelson MS, Brennan S, Joo S, Wen YH, et al. MR imaging features of triple-negative breast cancers. **Breast J** 2013; 19:643-9.

Svitkin YV, Pause A, Haghghat A, Pyronnet S, Witherell G, et al. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. **RNA** 2001; 7:382-94.

Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, et al. Breast cancer: epidemiology and etiology. **Cell Biochem Biophys** 2015; 72:333-8.

Tariq M, Ito A, Ishfaq M, Bradshaw E, Yoshida M. Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is essential for HIF-1 α activation in hypoxia. **Biochem Biophys Res Commun** 2016; 470:417-24.

Truitt ML, Ruggero D. New frontiers in translational control of the cancer genome. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:288-304.

Truitt ML, Conn CS, Shi Z, et al. Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer. **Cell** 2015; 162:59-71.

van Agthoven T, Sieuwerts AM, Meijer D, et al. Selective recruitment of breast cancer anti-estrogen resistance genes and relevance for breast cancer progression and tamoxifen therapy response. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:215-30.

Villa N, Do A, Hershey JW, Fraser CS. Human eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, -d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome. **J Biol Chem** 2013; 288:32932-40.

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

Voigts-Hoffmann F, Klinge S, Ban N. Structural insights into eukaryotic ribosomes and the initiation of translation. **Curr Opin Struct Biol** 2012; 22:768-77.

Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nat Rev Clin Oncol** 2009; 6:718-30.

Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **Lancet Oncol** 2010; 11:339-49.

Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R65.

Yang GF, Xie D, Liu JH, et al. Expression and amplification of eIF-5A2 in human epithelial ovarian tumors and overexpression of EIF-5A2 is a new independent predictor of outcome in patients with ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol** 2009; 112:314-8.

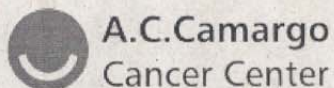
Yang Q, Ye Z, Zhang Q, Zhao Z, Yuan H. Expression of eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF5A-2) associated with poor survival in gastric cancer. **Tumour Biol** 2016; 37:1189-95.

Zang C, Liu H, Bertz J, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. **Mol Cancer Ther** 2009; 8:2296-307.

Zhou FF, Yan M, Guo GF, et al. Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells. **Med Oncol** 2011; 28:1302-7.

Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, et al. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. **EMBO J** 1995; 14:4065-72.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 06 de agosto de 2014.

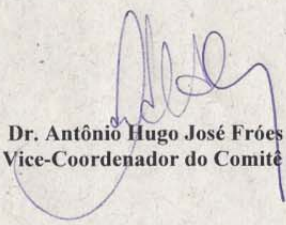
A
Dra. Glauca Hajj.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1844/13
“Translatômica aplicada ao descobrimento de alterações moleculares em tumores de mama”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 05/08/2014, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Relatório de Acompanhamento do estudo em referência, datado de 02 de julho de 2014;
- Emenda ao projeto, em carta datada de 25 de junho de 2014;
- Carta de Ciência e Comprometimento da Instituição colaboradora estrangeira (Karolinska Institutet – Estocolmo/Suécia), datada de 26 de junho de 2014 – e sua respectiva tradução;
- Projeto emendado, datado de junho de 2014.

Atenciosamente,



Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Capítulo intitulado “Comparative Effectiveness of HER2 in cancer: a pathology overview from diagnosis to treatment”

Capítulo intitulado “Comparative Effectiveness of *HER2* in cancer: A pathology overview from diagnosis to treatment”, publicado no livro: Comparative Effectiveness Research (CER): New Methods, Challenges and Health Implications, em 2016. Esta publicação foi fruto da colaboração do aluno com a Dra. Beatriz Melo Maia e o Dr. Rafael Malagoli Rocha.



Home Profiles Research Units Equipment **Research Output**

Comparative effectiveness of HER2 in cancer: A pathology overview from diagnosis to treatment

Beatriz de Melo Maia, Hermano Martins Bellato, Rafael Malagoli Rocha

Investigative Pathology

Research output: Research > Chapter

Abstract

In this chapter, the comparative effectiveness leaves the therapeutic focus to enter the field of diagnosis of some tumors. Overexpression or amplification of epidermal growth factor receptor-2 (HER2) is present with prognostic and predictive roles for therapeutic response, and has a crucial position regarding molecular classification of some high incidence tumors, such as Breast Cancer (BC). Currently, the large number of available anti-HER2 agents makes necessary the comparison of their effectiveness on diagnosis, with emphasis on breast cancer and tumors in which HER2 has recently been described, such as Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST). Many of these drugs have important differences related to mechanisms of how they act on patients and possible reactions they can cause. Taking into account the main advantages and disadvantages of each approach, this chapter aims to provide a comprehensive analysis of the available diagnostic methods in clinical practice, and to identify the main existing gaps between current molecular research and the needs of medical practice.

LANGUAGE	English (US)
TITLE OF HOST PUBLICATION	Comparative Effectiveness Research (CER): New Methods, Challenges and Health Implications
PUBLISHER	Nova Science Publishers, Inc.
PAGES	211-248
NUMBER OF PAGES	38
ISBN (ELECTRONIC)	9781634843164
ISBN (PRINT)	9781634843157
STATE	Published - Jan 1 2016

Apêndice 1 - Este anexo contempla as demais análises estatísticas feitas e não mostradas no capítulo 3 da seção 3 desta tese. Aqui estão organizadas as análises das demais variáveis clínicas com a expressão dos fatores estudados: eIF4E, eIF4G e eIF5A

Tabela de Avaliação estatística da relação entre os fatores de tradução estudados (eIF4E, eIF4G e eIF5A) com variáveis clínicas (TNM, grau nuclear, inflamação, invasão vascular, invasão linfática, invasão perineural e recorrência).

	Estadiamento	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
	T								
eIF4E	1	102	119,34	162,12	159,62	217,32	24,17	Teste não paramétrico para amostras independentes:	0,25
	2	87	117,84	166,79	163,87	221,33	22,44		
	3	23	131,30	161,17	156,37	199,35	22,37		
	Total	212	117,84	163,93	161,88	221,33	23,30		
eIF4G	1	96	72,91	154,90	154,28	207,65	23,79	Kruskal-Wallis	0,35
	2	78	86,52	160,64	161,38	210,89	25,14		
	3	20	134,55	159,48	157,62	190,75	16,70		
	Total	194	72,91	157,68	155,45	210,89	23,79		
eIF5A	1	105	109,88	150,93	148,30	209,60	20,84		0,09
	2	87	121,33	156,29	153,09	225,50	19,28		
	3	17	126,25	155,97	156,85	212,03	22,89		
	Total	209	109,88	153,57	150,48	225,50	20,45		
	Estadiamento	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
	N								
eIF4E	ausente	124	117,84	162,87	160,08	217,32	23,23	Teste para amostras independentes:	0,43
	presente	88	119,34	165,43	163,65	221,33	23,45		
	Total	212	117,84	163,93	161,88	221,33	23,30		
eIF4G	ausente	117	72,91	153,79	153,07	210,89	24,59	teste-t para igualdade de médias	0,01
	presente	77	123,89	163,59	162,54	209,62	21,33		
	Total	194	72,91	157,68	155,45	210,89	23,79		
eIF5A	ausente	124	109,88	152,73	150,19	225,50	20,50		0,47
	presente	85	118,08	154,81	150,79	209,60	20,43		
	Total	209	109,88	153,57	150,48	225,50	20,45		

	Estdiamento	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
	M								
eIF4E	ausente	203	117,84	163,79	160,95	221,33	23,44	Teste não	0,17
	presente	12	129,34	172,95	173,19	216,40	23,82	paramétrico	
	Total	215	117,84	164,30	161,95	221,33	23,50	para amostras	
eIF4G	ausente	186	72,91	157,71	155,59	210,89	24,05	indepentes:	0,47
	presente	10	132,56	162,53	163,57	188,22	19,66	Teste U de	
	Total	196	72,91	157,96	155,59	210,89	23,83	Mann-	
eIF5A	ausente	198	109,88	153,49	150,37	225,50	20,52	Whitney	0,48
	presente	13	123,79	155,77	156,04	199,53	18,48		
	Total	211	109,88	153,63	150,79	225,50	20,36		
	Grau nuclear	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	1	13	121,26	159,77	154,54	207,09	27,88	Teste não	0,31
	2	71	120,29	163,42	157,94	221,33	25,76	paramétrico	
	3	147	117,84	166,13	164,91	217,32	22,11	para amostras	
	Total	231	117,84	164,94	161,97	221,33	23,58	indepentes:	
eIF4G	1	9	142,07	161,55	153,82	207,37	19,74	Kruskal-	0,6
	2	63	125,96	157,21	154,59	206,43	19,48	Wallis	
	3	143	72,91	159,02	160,36	210,89	25,33		
	Total	215	72,91	158,60	156,46	210,89	23,48		
eIF5A	1	10	121,25	150,12	149,18	185,25	17,67		0,12
	2	66	109,88	150,57	146,78	209,60	20,47		
	3	151	118,26	155,82	154,13	225,50	21,36		
	Total	227	109,88	154,04	150,48	225,50	21,03		
	Inflamação	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	ausente	141	119,34	164,37	159,44	221,33	23,98	Teste para	0,84
	presente	87	117,84	165,00	166,17	217,32	22,83	amostras	
	Total	228	117,84	164,61	161,88	221,33	23,50	independentes:	
eIF4G	ausente	126	123,73	160,59	156,68	209,62	20,30	teste-t para	0,14
	presente	86	72,91	155,76	155,44	210,89	25,66	igualdade de	
	Total	212	72,91	158,63	156,33	210,89	22,70	médias	
eIF5A	ausente	134	109,88	153,33	150,11	224,33	21,76		0,79
	presente	90	118,26	154,06	150,37	225,50	19,03		
	Total	224	109,88	153,62	150,22	225,50	20,67		

	Invasão vascular	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	ausente	220	117,84	164,75	161,88	221,33	23,29	Teste não paramétrico para amostras independentes:	0,76
	presente	9	122,08	162,45	163,87	212,29	27,73		
	Total	229	117,84	164,66	161,95	221,33	23,42		
eIF4G	ausente	206	72,91	158,18	155,90	210,89	23,70	Teste U de Mann-Whitney	0,22
	presente	8	148,51	167,06	165,99	198,89	16,15		
	Total	214	72,91	158,51	156,33	210,89	23,50		
eIF5A	ausente	217	109,88	153,59	150,17	225,50	20,72		0,26
	presente	9	129,32	162,83	159,15	224,33	27,52		
	Total	226	109,88	153,96	150,37	225,50	21,03		
	Invasão linfática	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	ausente	176	117,84	164,99	161,16	221,33	23,67	Teste para amostras independentes:	0,69
	presente	53	122,08	163,55	163,80	212,43	22,74		
	Total	229	117,84	164,66	161,95	221,33	23,42		
eIF4G	ausente	167	72,91	158,26	155,61	210,89	24,20	teste-t para igualdade de médias	0,75
	presente	47	123,73	159,39	159,93	204,04	21,02		
	Total	214	72,91	158,51	156,33	210,89	23,50		
eIF5A	ausente	180	109,88	154,42	150,93	225,50	20,83		0,53
	presente	46	118,26	152,15	149,73	224,33	21,97		
	Total	226	109,88	153,96	150,37	225,50	21,03		
	Invasão perineural	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	ausente	202	117,84	165,16	161,88	221,33	23,66	Teste não paramétrico para amostras independentes:	0,59
	presente	27	119,34	160,92	163,43	194,34	21,58		
	Total	229	117,84	164,66	161,95	221,33	23,42		
eIF4G	ausente	192	72,91	158,45	155,45	210,89	24,16	Teste U de Mann-Whitney	0,78
	presente	22	123,89	159,02	159,52	192,83	17,08		
	Total	214	72,91	158,51	156,33	210,89	23,50		
eIF5A	ausente	204	109,88	154,42	151,45	225,50	21,04		0,23
	presente	22	118,36	149,71	145,99	194,46	20,94		
	Total	226	109,88	153,96	150,37	225,50	21,03		

	Recorrendia	n	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	Teste estatístico	p
eIF4E	Não ocorreu	194	117,84	164,53	160,66	221,33	24,24	Teste para amostras independentes: teste-t para igualdade de médias	0,48
	Ocorreu	37	120,14	167,11	163,80	216,40	19,91		
	Total	231	117,84	164,94	161,97	221,33	23,58		
eIF4G	Não ocorreu	185	78,74	158,71	156,19	210,89	23,05	teste-t para igualdade de médias	0,87
	Ocorreu	30	72,91	157,89	158,35	203,78	26,40		
	Total	215	72,91	158,60	156,46	210,89	23,48		
eIF5A	Não ocorreu	195	109,88	153,54	150,05	225,50	21,13		0,46
	Ocorreu	33	121,41	156,41	156,04	195,17	20,51		
	Total	228	109,88	153,96	150,37	225,50	21,02		