

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Franklin Fernandes Pimentel

Superexpressão simultânea das proteínas

HER2 e WIPF2 no câncer de mama

Ribeirão Preto
2010

FRANKLIN FERNANDES PIMENTEL

Superexpressão simultânea das proteínas

HER2 e WIPF2 no câncer de mama

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de concentração: Tocoginecologia
Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães
Tiezzi

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

Pimentel, Franklin Fernandes

Superexpressão simultânea das proteínas HER2 e WIPF2 no câncer de mama/ Franklin Fernandes Pimentel; orientador Daniel Guimarães Tiezzi – Ribeirão Preto, 2010.

69f.: 3 fig., 6 fotos, 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Área de Concentração: Tocoginecologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Câncer de mama – Tratamento.
2. Imunohistoquímica – Fatores prognósticos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Franklin Fernandes Pimentel

Superexpressão simultânea das proteínas HER2 e WIPF2 no câncer de mama

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Daniela e Pedro, minha esposa e querido filho, pelo nosso amor e pela compreensão das longas horas de ausência enquanto elaborava esse trabalho. Serão sempre minhas maiores inspirações para o crescimento pessoal-profissional e minha força para superar os obstáculos da vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha mãe, Sueli, *in memoriam*, minha maior amiga e mestra, exemplo de mãe. Dedico meu eterno amor a quem me ensinou e apoio, comemorou minhas vitórias, consolou-me nas derrotas. Estará sempre comigo, junto das minhas melhores lembranças;

Ao meu pai João Francisco e meu irmão Weblen e pelo carinho e pelo incentivo incondicional, companheiros em todos os momentos. Sempre meus referenciais em todos momentos felizes e tristes da vida.

AGRADECIMENTOS

À minha nova família: minha cunhada Amanda, minha sogra Alice, meu sogro José, minha cunhada Juliana e cunhado Marlon, que docemente me receberam e sempre estiveram comigo quando precisei;

Ao Prof. Daniel Guimarães Tiezzi, grande amigo e orientador. Pelas muitas horas de convívio e ensinamentos, descobri um grande exemplo de professor a ser seguido. Levarei sempre o orgulho de ter sido seu primeiro orientado;

Ao Prof. Jurandyr Moreira de Andrade, grande amigo e incentivador, pelo apoio e pela orientação no início da pós-graduação, pelo aprendizado no exercício da Mastologia e por tudo o que me transmitiu no campo da pesquisa e da prática, dedico esse trabalho com gratidão;

Ao Prof. Benedito H. Machado, do Departamento de Fisiologia – FMRP – USP, meu primeiro orientador e incentivador na graduação, extremamente dedicado em suas pesquisas, responsável pela minha iniciação científica, levarei sempre minha eterna gratidão;

Ao Prof. Eduardo B. Coelho, grande amigo e orientador, minha gratidão pelas horas de convívio e pelo grande exemplo de profissional que tive durante minha formação;

Ao Prof. Francisco J. C. dos Reis, Prof. Heitor R. C. Marana, Prof. Hélio H. A. Carrara e Prof. Paulo M. P. Philbert e, grandes amigos, pessoas unanimemente queridas, sempre exemplos que seguirei na minha vida profissional e acadêmica;

Aos amigos Dr. Joaquim M. Sarmiento F^o, Dr. Willian S. Clagnan, Dr. Fábio E. Zola e Profa. Fernanda M. Peria que contribuíram enormemente para meu aprendizado na Mastologia e hoje ainda posso ter o privilégio de trabalharmos juntos;

À Dra. Viviane F. Schiavon e Dra. Stefânia C. Monteiro, minhas eternas R4, sempre “irmãs mais velhas” e Dr. Rodrigo M. Rocha, minha dupla, a quem eu devo muito pelo aprendizado, pelo sacerdócio que me ensinaram a lidar com a Mastologia e pela dedicação que sempre dispensaram a todos que os cercam;

Aos amigos Dr. Renato Abrão, Dr. Ângelo Mathes, Heloísa Mathes e Thaís Gozzo, que mesmo não tendo mais contato cotidiano, fizeram parte dos meus primeiros passos na Mastologia e me ajudaram na solidificação de uma base científica e humana;

Ao Prof. Alfredo R. da Silva e à Deyse pela amizade e ajuda com os TMAs e imunohistoquímicas realizados nesse trabalho;

Às amigas Cristina, Carmen, Eliana e Jandaci do SAME (Serviço de Arquivos Médicos) por toda a atenção e prontidão com que disponibilizaram os prontuários médicos necessários para a realização desse trabalho;

Aos amigos Júnior e Décio, do Serviço de Arquivo da Patologia, por toda atenção e prontidão na disponibilização dos blocos e lâminas necessários para a realização desse trabalho;

Ao Prof. Sérgio Zuccoloto e Prof. Fernando Chaud, do Departamento de Patologia, pela ajuda na realização desse trabalho, disponibilizando os materiais necessários;

Ao Prof. Fernando Soares, do Departamento de Patologia do AC Carmargo, pela prestimosa realização das lâminas de TMA analisadas neste estudo;

Ao Prof. Maarten Boslan e Ryan Deaton, da University of Illinois Chicago, pela atenção e presteza na realização das aquisições e análises digitais das amostras;

Ao Prof. Antônio Alberto Nogueira, coordenador do Serviço de Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela amizade, atenção e incentivo; e a Suelen S. Bezerra, secretária junto ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pelo auxílio nos trâmites burocráticos dentro da pós-graduação;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP e ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP pela oportunidade da realização de minha pós-graduação.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

PIMENTEL, F. P. **O amplicon 17q12-q21: superexpressão simultânea das proteínas HER2 e WIPF2 no câncer de mama.** 2010 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: O câncer de mama que apresenta amplificação/superexpressão do HER2 apresenta-se com pior prognóstico e seu amplicon se localiza no locus 17q12-q21. O gene WIPF2, relacionado a motilidade celular, localiza-se no mesmo locus e também se encontra presente no amplicon do HER2. Objetivo: Avaliar a superexpressão simultânea do HER2 e WIPF2 através de marcação imunohistoquímica. Métodos: Foram selecionados 94 casos de carcinoma ductal invasor de mama, sendo possível a obtenção de material em 87. Foi realizada técnica de microarranjo tecidual e as lâminas foram analisadas. Informações clínicas foram obtidas de prontuário médico. Resultados: Após microscopia óptica das lâminas de TMA obtidas e comparação com lâminas convencionais arquivadas, validou-se o método, com bom índice de correlação kappa (0,83 para receptores de estrógeno e 0,84 para receptores de progesterona). Houve associação entre a superexpressão do WIPF2 com casos Ki-67 positivos e em pacientes nuligestas. O grupo HER2 apresentou maior porcentagem de casos WIPF2 positivos em relação ao grupo triplo-negativo à microscopia óptica (66,7% vs. 22,7%, respectivamente; $p=0,03$). Na análise digital, o perfil molecular HER2 apresentou maior expressão do WIPF2 em relação ao perfil luminal A e ao triplo negativo ($23,9 \pm 9,0\%$ vs. $14,6 \pm 9,0\%$ e $14,2 \pm 9,0\%$, respectivamente; $p=0,01$). Conclusão: O WIPF2 é mais expresso por tumores com o perfil HER2, assim como se associa a tumores com maior proliferação e tumores em pacientes nulíparas.

Palavras-chave: Câncer de mama – Transição epitélio mesênquima – HER2 – WIPF2

ABSTRACT

PIMENTEL, F. P. **Simultaneous overexpression of HER2 and WIPF2 proteins in breast cancer.** 2010 69f. Dissertation (Master Degree) –

Introduction: The breast cancer with amplification/overexpression of HER2 shows worse prognosis and its amplicon is located in the 17q12-21 locus. The gene WIPF2, related to cellular mobility, is located in the same locus and is also present in the HER2 amplicon. Aim: To evaluate HER2 and WIPF2 simultaneous overexpression using immunohistochemistry technique. Methods: We selected 94 invasive ductal carcinoma samples and it was possible to evaluate 87. Tissue microarray has been done and slides analyzed. Clinical informations were obtained from clinical files. Results: After optical microscopy of TMA slides and comparison with conventional slides, the method was validated with a high correlation kappa index (0.83 for estrogen receptors and 0.84 for progesterone receptors). The WIPF2 overexpression was associated with positive Ki-67 tumors and nulipparous women. The HER2 group presented greater percentage of WIPF2 positive cases when compared with triple-negative group using optical microscopy (66.7% vs. 22.7%, respectively, $p=0.03$). With the digital analysis, the HER2 group presented greater expression of WIPF2 when compared with luminal A and triple-negative groups ($23.9 \pm 9.0\%$ vs. $14.6 \pm 9.0\%$ e $14.2 \pm 9.0\%$, respectively; $p=0.01$). Conclusion: WIPF2 is more expressed in the HER2 group tumors. It is also related to high proliferation index and nulipparous women's tumors

Keywords: Breast cancer – EMT – HER2 – WIPF2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. O câncer de mama e a transição epitélio-mesênquima	15
1.2. O gene ERBB2 e o amplicon	16
1.3. O WIPF2 e a interação com a proteína WAS/WASL	18
1.4. WIPF2 e PDGF	20
1.5. HER2 e WIPF2	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Principal	24
2.2. Secundários	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Cultura celular	26
3.2. Avaliação da expressão gênica em células de cultura	26
3.3. Critérios de seleção dos blocos	27
3.4. Caracterização da população	28
3.4.1. Variáveis relacionadas às pacientes	28
3.4.2. Variáveis relacionadas ao tumor	29
3.5. Microarranjos teciduais (TMA, do inglês “ <i>tissue microarray</i> ”)	29
3.6. Imunohistoquímica para RE, RP, Ki-67, HER-2 e WIPF2	31
3.7. Expressão de RE, RP, HER2 e Ki-67	32
3.8. Expressão da proteína WIPF2	35
3.9. Análise digital de Ki-67	35
3.10. Análise digital do WIPF2	37
3.11. Análise estatística	37
3.12. Aspectos éticos	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Avaliação da expressão gênica em cultura celular	40
4.2. Validação do TMA como método para pesquisa em câncer de mama	41
4.3. Classificação do câncer de mama de acordo com o perfil molecular	42
4.4. Superexpressão do WIPF2 – Microscopia óptica	43
4.4.1. Análise do WIPF2 de acordo com o perfil molecular	43
4.4.2. Análise do WIPF2 de acordo com o HER2	44

4.4.3. Variáveis associadas à superexpressão do WIPF2	44
4.4.3.1. Idade	44
4.4.3.2. Status menopausal	45
4.4.3.3. Paridade	46
4.4.3.4. Acometimento axilar	46
4.4.3.5. Estadio clínico	47
4.4.3.6. Grau de diferenciação	47
4.4.3.7. Receptor de estrógeno (RE).....	48
4.4.3.8. Receptor de Progesterona (RP)	48
4.4.3.9. Ki-67	49
4.5. Superexpressão do WIPF2 – Análise digital.....	49
4.5.1. Análise digital do WIPF2 de acordo com o perfil molecular	49
4.5.2. Análise digital de outras variáveis	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer de mama e a transição epitélio-mesênquima

A capacidade que um carcinoma da mama tem de desenvolver metástase a distância é o principal fator prognóstico da doença, já que a morte pelo câncer de mama é secundária ao desenvolvimento de doença metastática. Para infiltrar o estroma e ter acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos, as células epiteliais malignas devem desativar o mecanismo de adesão célula-célula e adquirir propriedades locomotoras. Este fenótipo celular observado nas células epiteliais tem sido denominado de transição epitélio-mesênquima (EMT) (Thiery, 2002; Yang et al., 2004) e foi primariamente descrito durante alguns processos fisiológicos envolvidos na embriogênese e no reparo tecidual. O interesse atual neste processo baseia-se na sua associação com o mecanismo patológico de várias doenças, incluindo a progressão do câncer de mama (Thiery, 2002).

Duas alterações específicas são necessárias para uma célula epitelial adquirir propriedades específicas de célula mesenquimal. A primeira delas é a perda da transcrição de proteínas epiteliais, como a caderina-e (Kang e Massague, 2004; Lee et al., 2006). A caderina-e é um componente importante da *zonula adherens* e regula a adesão celular homofílica dependente de cálcio. A sua expressão tem sido descrita como disfuncional ou ausente na maior parte dos carcinomas indiferenciados e em estadios avançados de carcinoma da mama ou originários de outros epitélios (Wheelock e Johnson, 2003). A segunda alteração é um aumento da expressão de proteínas específicas do mesênquima, como a fibronectina, a vimentina e a actina de músculo liso. Este padrão de expressão protéica está associado a mudanças abruptas na organização do citoesqueleto e perda da polaridade ápico-baso-lateral (Hay, 1995; Grunert et al., 2003; Debnath e Brugge, 2005).

Utilizando um modelo *in vitro-in vivo* de transformação maligna de células ductais induzida por estrogênio, Tiezzi, DG et al., 2007 demonstraram que, durante o processo da

carcinogênese, existe um aumento progressivo da capacidade celular em ativar o processo de transição mesenquimal com redução progressiva da expressão de caderina-e e aumento da expressão de vimentina e fibronectina-1, fatores relacionados à maior capacidade de invasão tumoral.

1.2. O gene ERBB2 e o amplicon

O gene ERBB2 está localizado no braço longo do cromossomo 17 (q21) e codifica a proteína HER2, que é o membro número dois da família dos receptores de membrana do fator de crescimento epidérmico humano (Gusterson et al., 1992).

A amplificação do ERBB2, associada à superexpressão do HER2, é encontrada em 16-32% dos carcinomas da mama e muitos estudos têm demonstrado que essa alteração se associa a indiferenciação histológica e comportamento mais agressivo (Gusterson et al., 1992; Pauletti et al., 1996; Tanner et al., 2006; Tiezzi, Andrade et al., 2007).

O diagnóstico da amplificação do gene ERBB2 pode ser realizado diretamente por FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), CISH (*Chromogenic in situ hybridization*) ou PCR (*Polymerase chain reaction*); ou indiretamente, pela avaliação da expressão de sua proteína, por imunohistoquímica, com boa correlação para aplicação clínica (Larsimont et al., 2002; Murthy et al., 2005; Bilous et al., 2006; Tanner et al., 2006), apresentando aplicabilidade em prever resposta ao tratamento com terapia-alvo dirigida ao HER2.

O locus 17q12-q21 do cromossomo humano codifica também uma série de outros genes relevantes, como é o caso do gene da topoisomerase II alfa (TOP2A), o qual é descrito como um fator de resistência ao tratamento quimioterápico com antraciclinas (Jarvinen e Liu, 2003) e se localiza a aproximadamente 650kb do locus do ERBB2 (figura 1- adaptada da Biblioteca Genes Pubmed).

Genes_seq	Symbol	Cyto	Description
	STARD3	17q11-q12	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3
	TCAP	17q12	titin-cap (telethonin)
	PNMT	17q21-q22	phenylethanolamine N-methyltransferase
	ERBB2	17q21.1	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
	C17orf37	17	chromosome 17 open reading frame 37
	GRB7	17	growth factor receptor-bound protein 7
	IKZF3	17q21	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)
	RPL39P4	17q21.1	ribosomal protein L39 pseudogene 4
	GSDMB	17	gasdermin B
	ORMDL3	17q12-q21.1	ORM1-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)
	GSDMA	17	gasdermin A
	PSMD3	17	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit
	CSF3	17q11.2-q12	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
	SNORD124	17q21.1	small nucleolar RNA, C/D box 124
	MED24	17	mediator complex subunit 24
	NR1D1	17q11.2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
	MSL1	17	male-specific lethal 1 homolog (<i>Drosophila</i>)
	CASC3	17q11-q21.3	cancer susceptibility candidate 3
	RAPGEFL1	17	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1
	LOC100287488	17	hypothetical protein LOC100287488
	WIPF2	17	WAS/WASL interacting protein family, member 2
	CDC6	17q21.3	cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
	RARA	17q21	retinoic acid receptor, alpha
	GJD3	17	gap junction protein, delta 3, 31.9kDa
	LOC100287525	17	hypothetical protein LOC100287525
	TOP2A	17q21-q22	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
	RPL23AP75	17	ribosomal protein L23a pseudogene 75
	LOC100287562	17	hypothetical protein LOC100287562
	IGFBP4	17q12-q21.1	insulin-like growth factor binding protein 4
	TNS4	17	tensin 4

Figura 1: Esquema representativo dos genes existentes no locus 17q12-q21, evidenciando os genes ERBB2 (HER2) e TOP2A (circulados em vermelho) e o gene WIPF2 (em destaque) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/147179>).

A região mínima comum do amplicon 17q12-21 foi relatada com um tamanho de aproximadamente 280kb e contém 10 genes (Kauraniemi et al., 2003). O tamanho total da região amplificada é muito variável entre os tumores (Usha et al., 2008) e devido às diferenças apresentadas, podem ser divididas em quatro grupos diferentes: amplificação simultânea do ERBB2 e da TOP2A (25%), amplificação somente do ERBB2 (25%), amplificação do ERBB2 e de genes próximos, sem amplificação da TOP2A (25%) e amplificação do ERBB2 com deleção da TOP2A (25%). Os tumores que apresentam

amplificação simultânea do ERBB2 e do TOP2A apresentam pior prognóstico e esses fatores são descritos como independentes (Fritz et al., 2005).

Os genes amplificados contidos em determinado amplicon são descritos como possíveis influenciadores no processo de maior agressividade tumoral, cooperando para maior proliferação, menor apoptose e maior resistência a quimioterápicos (Usha et al., 2008). Dessa forma, de acordo com trabalho de Arriola e análise de banco de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/ e www.genome.ucsc.edu) é possível verificar a presença do gene WIPF2 entre o ERBB2 e a TOP2A, a cerca de 500kb do primeiro (Arriola et al., 2008).

A quantificação da proliferação tumoral, por outro lado, pode ser associada à marcação imunohistoquímica para o antígeno Ki-67, expresso somente por células que iniciaram o processo divisão celular (interfase e mitose). A positividade do Ki-67 se associa a pior prognóstico e pode ser utilizada na prática clínica por ser simples e barata (Wiesner et al., 2009). A quantificação final através desse método corresponde à porcentagem de células tumorais que apresentaram núcleos marcados pela reação.

1.3. O WIPF2 e a interação com a proteína WAS/WASL

A proteína WAS (*Wiskott-Aldrich Syndrome*- Síndrome de Wiskott-Aldrich) foi primeiramente descrita em células hematopoéticas, tendo como função a polimerização da actina e alterações no citoesqueleto, permitindo a função fisiológica de células imunes. Após sua descoberta, outras proteínas da mesma família foram descritas como WASL (*WAS like*), nomeadas como N-WASP (*neural WAS protein*) e Scar/WAVE.

As proteínas relacionadas à WAS apresentam-se na forma inativa (chamada de “forma fechada”- *closed N-WASP*) e podem se converter na forma ativa (“forma aberta”- *open VCA*)

através da formação de complexo com proteínas de interação, como o WIP (*WAS/WASL interacting protein*), WIPF2 (também chamado de WICH ou WIRE) e a CR16. Após a formação do complexo, a proteína torna-se estável e pode ser ativada pelo estímulo originado da ligação do PIP2 e do Cdc42, relacionados à GMPase, nos sítios B e CRIB, respectivamente. Outra forma de ativação é através da ligação do SH3 no domínio BAR (*BAR domain*) na região rica em prolina (Kurisu e Takenawa, 2009) (figura 2).

Dessa forma, através de dois mecanismos, o complexo WAS/WASL-WIPF2 pode mudar sua conformação e expor a terminação VCA, que se liga ao Arp 2/3 (*actin-related protein*, proteína relacionada à actina), correspondendo ao fim do processo de sinalização. A partir desse momento, o Arp 2/3 liga-se a actina-G (*G-actin*) e inicia a etapa de polimerização (*actin polymerization*), com formação da lamelipodia e do filopodia (*membrane deformation*) (Kato e Takenawa, 2005). Essas estruturas formam projeções no citoplasma celular que são necessárias para a motilidade celular (Small et al., 2002; Disanza et al., 2005).

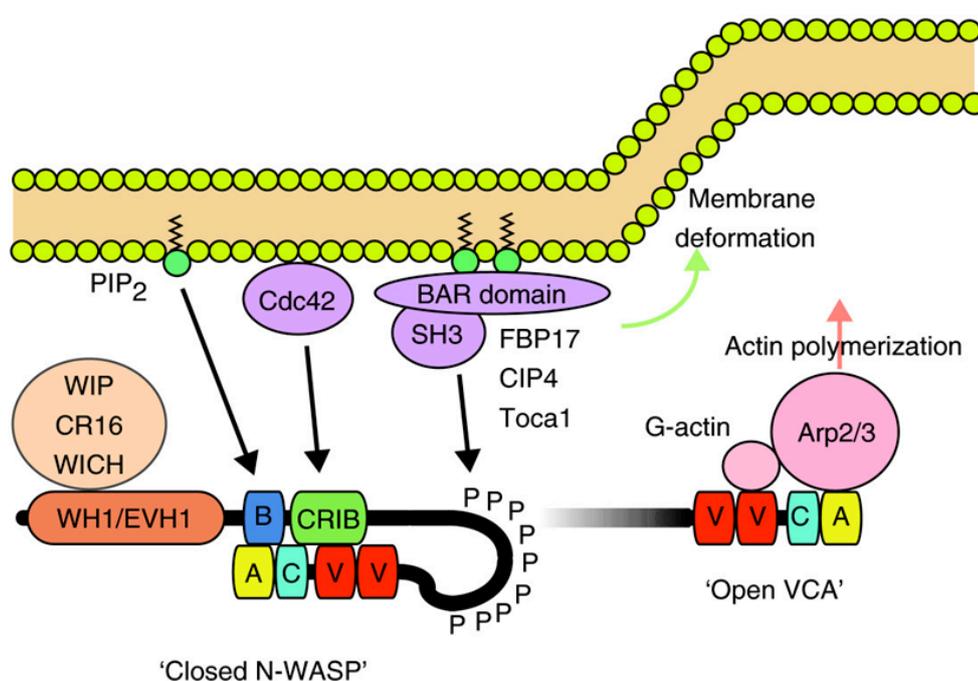


Figura 2: Esquema mostrando a formação de complexo através da ligação do WIP na região WH1/EVH1 (amino-terminal) da N-WASP, possibilitando que os estímulos originados da ligação com o PIP2, Cdc42 e SH3 mudem a conformação e permita a ligação da região VCA (carboxi-terminal) ao Arp2/3 para início da polimerização da actina (Kurisu e Takenawa, 2009).

1.4. WIPF2 e PDGF

Em relação às funções do WIPF2, evidenciou-se que essa proteína é capaz de se ligar ao substrato Nckbeta, um substrato do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF - *platelet-derived growth factor*) (Aspenstrom, 2002). Dessa forma, ao usarem células que expressavam WIPF2 e incubarem com PDGF notou-se a formação de estruturas semelhantes à filopodias e lamelipodias, descrevendo essa interação como a responsável pelo início da motilidade celular.

Estudo prévio de Jechlinger e cols. relatou a importância do PDGFR no processo de metástase no câncer de mama e na manutenção da célula tumoral durante o processo de EMT. Comprovaram também que a inibição do PDGFR provocou apoptose em linhagens de tumor de mama murino e humano (Jechlinger et al., 2006).

É relatado também que, no câncer de mama, ocorre migração de células-tronco originárias do tecido adiposo através de sinalização pelo PDGF e que a inibição desse receptor diminui a migração (Gehmert et al., 2010), considerando o PDGF como um importante fator no controle do microambiente entre células tumorais e as células tronco residentes no tecido.

Como o WIPF2 se relaciona com o PDGF e com a motilidade celular via polimerização da actina, pode-se considerar a possibilidade dessa proteína integrar sinal e ação final de migração celular na interação do tumor com células-tronco.

1.5. HER2 e WIPF2

Apesar das evidências encontradas em relação à proximidade dos genes ERBB2 e WIPF2, da presença do WIPF2 em amplicon que contém os genes HER2 e TOP2A (Arriola et

al., 2008) e da possível interação entre eles na transição epitélio-mesênquima devido a existência de uma via de sinalização da motilidade celular integrando esses dois fatores (figura 3) (Genomes, 2010), não existem estudos que avaliaram sua amplificação ou superexpressão concomitante no carcinoma de mama. Este processo molecular pode estar relacionado com a capacidade que os carcinomas da mama HER2 positivos têm de metastatizar, fornecendo a base molecular para o fenótipo que se apresenta mais agressivo.

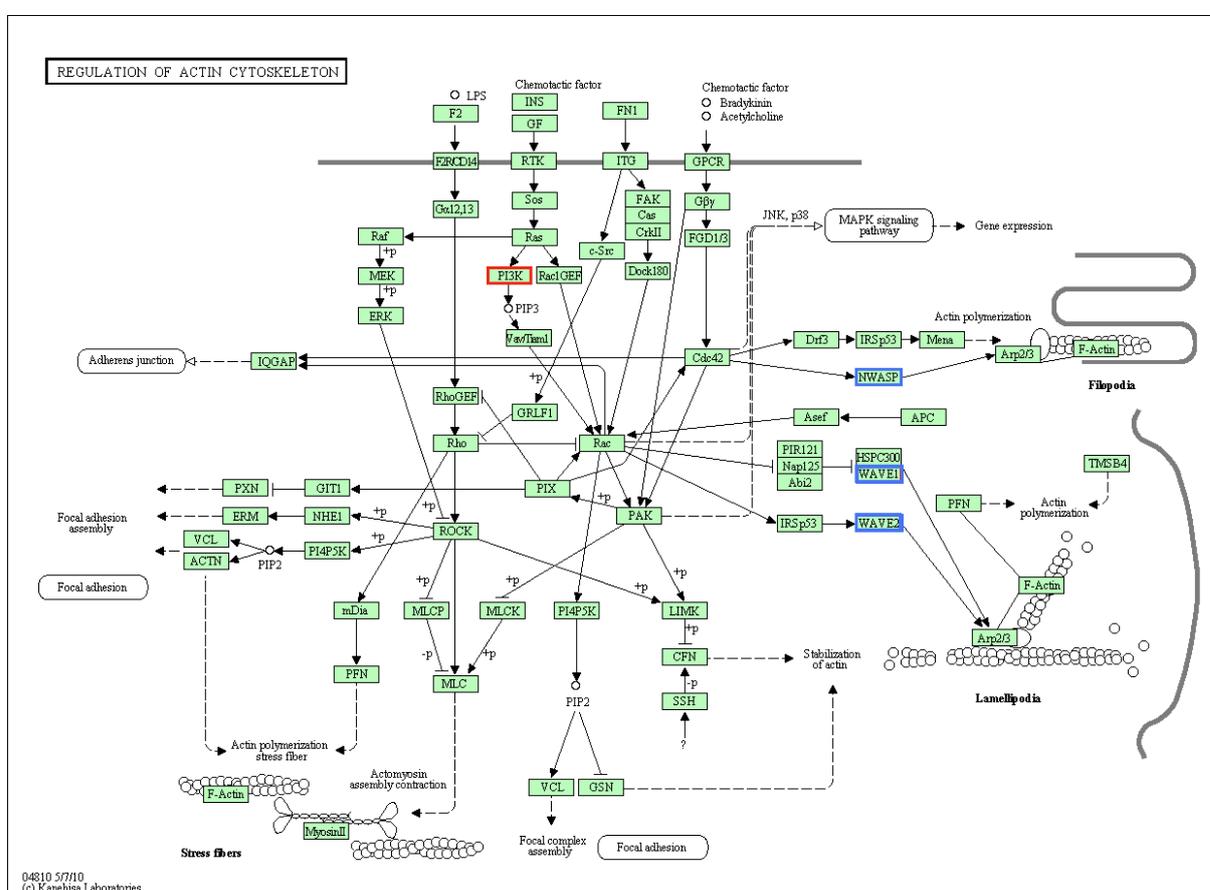


Figura 3: Esquema mostrando as vias envolvidas no processo de regulação do citoesqueleto de actina. O PI3K (fosfatidil inositol 3-fosfato) é regulado pela sinalização do HER2 (retângulo vermelho), enquanto a NWASP, WAVE1 e WAVE2 (retângulos azuis) são sítios de ligação do WIPF2 (adaptado de KEGG Pathway Database - <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04810.html>).

Portanto, confirmar a presença da superexpressão do gene WIPF2 cria a oportunidade de investigar a sua exata função como um gene adjuvante no processo de transição epitélio-

mesênquima e fornece substrato para o desenvolvimento de uma nova possibilidade de terapia alvo no câncer de mama.

A observação de que genes, com funções relacionadas à progressão do câncer de mama, podem estar presentes no mesmo amplicon onde se encontra o ERBB2 gera a hipótese de que uma ação sinérgica entre eles possa estar associada com a agressividade apresentada pelos tumores com reconhecida superexpressão do HER2.

Dessa forma, a amplificação do locus 17q12-q21 pode ser o principal fator prognóstico, e não somente a amplificação do gene ERBB2. Assim, este estudo tem como objetivo principal analisar se existe superexpressão simultânea do WIFP2 em carcinomas de mama com reconhecida superexpressão do HER2.

2. OBJETIVOS

2.1. Principal

- Avaliação da expressão simultânea do WIPF2 e do HER2 no câncer de mama.

2.2. Secundários

- Avaliação da expressão do HER2 e WIPF2 em células cultivadas, linhagens MCF7 e SKBR3.
- Validação da metodologia TMA (*tissue microarray*, micro-arranjo tecidual) para pesquisa em câncer de mama.
- Classificação dos casos selecionados de câncer de mama de acordo com o perfil molecular (luminal A, luminal B, triplo-negativo e HER2 positivo).
- Avaliação da expressão da proteína WIPF2 no carcinoma ductal de mama de acordo com diversas variáveis relacionadas às pacientes, ao tumor e ao tratamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura celular

Culturas celulares das linhagens MCF7 e SKBR3 foram realizadas. A linhagem MCF7 foi cultivada em meio DMEM + 10% soro fetal bovino (SFB), enquanto a linhagem SKBR3 foi cultivada em meio McCoy's 5A + 10% SFB. Ambas foram mantidas em estufa a 37° e 5% CO₂.

Essas linhagens foram selecionadas, pois a MCF7 não apresenta amplificação do ERBB2 e, por isso, pode ser considerada controle na avaliação desse gene. A linhagem SKBR3 foi escolhida por apresentar amplificação do ERBB2. Dessa forma, objetivou-se a análise de cópias desse gene, em comparação com a linhagem MCF7, assim como a comparação do WIPF2.

3.2. Avaliação da expressão gênica em células de cultura

O RNA total foi isolado das células em crescimento, quando atingiram 70-80% de confluência, usando TRIzol (Life Technologies, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) e purificado usando RNeasy kit (Qiagen). A concentração e qualidade do RNA foram determinadas por espectrofotometria. *Real time RT-PCR* (reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real) foi usado para quantificar a expressão de ERBB2 e WIPF2.

Foi usado kit TaqMan One Step RT-PCR (Applied Biosystems) e os ensaios foram realizados usando instrumentos Applied Biosystems 7900 HT, utilizando-se as sondas para ERBB2 (HS00370193_M1; Applied Biosystem) e para WIPF2 (HS00170433_M1; Applied Biosystem).

O Ct (*threshold cycle*) foi calculado usando 25 ng de amostra de RNA para cada amostra. A proteína TATA box-binding (TBP) foi usada como controle endógeno do RNA e cada amostra foi normalizada usando como base seu Ct TBP. O Ct foi definido como a fração do número de ciclos em que a fluorescência gerada pela clivagem do probe passasse a linha de base estabelecida.

O software SDS 2.1, que se baseia na comparação pelo método Ct, foi usado para a análise. O método comparativo calculou a expressão gênica relativa usando a seguinte equação: quantidade relativa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (User Bulletin 2, Applied Biosystems). Para cada gene, o nível de expressão controle foi considerado como a média dos valores obtidos com a linhagem celular MCF7.

3.3. Critérios de seleção dos blocos

Foram selecionados 96 blocos de parafina com amostras de câncer de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico nos anos de 2005 a 2007 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Para a inclusão, essas amostras deveriam ser carcinomas ductais invasores e as pacientes não poderiam ter sido submetidas a nenhum tratamento prévio. Outros tipos histológicos de câncer de mama e as amostras que haviam sido obtidas após tratamento quimioterápico ou hormonioterápico foram excluídas.

Dessa forma, a seleção foi baseada no tipo histológico (carcinoma ductal invasor) e no perfil de expressão de receptores hormonais (RH) e do HER2. Os grupos foram divididos em: tumores RH positivo e HER2 negativos (denominados de Grupo Luminal A), tumores RH positivo e HER-2 positivo (denominados de Grupo Luminal B), tumores RH negativos com HER2 positivo (denominados de Grupo HER2) e tumores RH e HER2 negativos

(denominados de Grupo Triplo-Negativo). Os receptores hormonais foram analisados segundo a escala de Allred e considerados positivos os casos com escore maior ou igual a 3 (Harvey et al., 1999). O HER2 foi analisado segundo recomendação da “American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists” (Wolff et al., 2007).

3.4. Caracterização da população

As variáveis analisadas, coletadas do prontuário médico, foram relacionadas às pacientes e ao tumor, sendo descritas a seguir.

3.4.1. Variáveis relacionadas às pacientes

Do grupo selecionado, as pacientes apresentavam média de idade de 55,3 anos \pm 13,6 anos (tabela 1). A raça foi classificada como branca em 79 casos (90,8%), mulata em cinco casos (5,8%) e negra em três casos (3,4%). Em relação à menopausa (considerada como última menstruação há mais de um ano) na data do diagnóstico, 58 casos estavam na pós-menopausa (66,7%) e 29 casos na pré-menopausa (33,3%). Em relação à paridade, oito eram nuligestas (9,2%) e 79 não nuligestas (90,8%) (tabela 1).

Segundo os antecedentes pessoais, foi relatado apenas um caso com carcinoma ductal *in situ* na mesma mama, tratado com tumorectomia e radioterapia três anos antes. Segundo os antecedentes familiares foram relatados 10 casos de carcinoma de mama em parente de primeiro grau e seis casos de carcinoma de mama em parente de segundo grau.

3.4.2. Variáveis relacionadas ao tumor

A média do maior diâmetro (\pm DP) das lesões amostradas foi de $3,6 \pm 1,9$ cm. Em relação ao grau de diferenciação, houve 10 casos grau I (bem diferenciado; 11,5%), 52 casos grau II (moderadamente diferenciado; 59,8%) e 25 casos grau III (pouco diferenciado; 28,7%). A axila estava sem acometimento em 37 casos (42,5%), com acometimento de 1 a 3 linfonodos em 28 casos (32,2%) e com mais de 3 linfonodos acometidos em 22 casos (25,3%) (tabela 1).

Dentre os estadios clínicos (EC) (EZTNM for the AJCC cancer staging manual, 2003) (Adendo 1), os casos selecionados encontravam-se: EC I: 8 pacientes (T1N0M0: 8 - 9,2%), EC IIA: 44 pacientes (T1N1M0: 4/ T2N0M0: 37/ TxN0M0: 3 - 50,6%), EC IIB: 18 pacientes (T2N1M0: 10/ T3N0M0: 8 - 20,7%), EC IIIA: 9 pacientes (T2N2M0: 4/ T3N1M0: 3/ T3N2M0: 2 - 10,3%), EC IIIB: 7 pacientes (T4N0M0:2/ T4N1M0: 3/ T4N2M0: 2 - 8,0%) e EC IV: 1 paciente (T4N2M1: 1 - 1,2%) (tabela 1).

3.5. Microarranjos teciduais (TMA, do inglês “*tissue microarray*”)

A seleção dos fragmentos foi feita através da análise das lâminas arquivadas, previamente coradas pela hematoxilina e eosina. A partir dos blocos de parafina correspondentes aos fragmentos mais representativos de cada lesão, foram feitos TMAs segundo protocolo descrito por Pires et al., 2006.

Foram colocados 194 cilindros por bloco (agulhas 16G = $1,1 \text{ mm}^2$ de área por cilindro) (Pires et al., 2006), sendo dois cilindros de cada caso amostrado ($94 \times 2 = 192$ cilindros) mais dois cilindros de placenta armazenada em parafina, para servir de referência na leitura das lâminas. A partir de cada bloco de TMA foram feitos cortes histológicos de três

micrômetros em micrótomo rotativo convencional (Microm HM315, Walldorf, Alemanha). Os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro embebidas pela poli-lisina a 8% (foto 1).

Tabela 1. Características apresentadas pelas pacientes que tiveram amostras tumorais analisadas no estudo, relacionadas como média e desvio padrão (DP) ou número absoluto e porcentagem.

	<i>Média ± DP</i>	<i>Número</i>	<i>Porcentagem</i>
<i>Idade (anos)</i>	55,3 ± 13,6		
Raça			
<i>Branca</i>		79	90,8
<i>Parda</i>		5	5,8
<i>Negra</i>		3	3,4
Status Menopausal			
<i>Pré-Menopausa</i>		29	33,3
<i>Pós Menopausa</i>		58	66,7
Paridade			
<i>Nuligesta</i>		8	9,2
<i>Não nuligesta</i>		79	90,8
<i>Maior diâmetro (cm)</i>	3,6 ± 1,9		
Grau de diferenciação			
<i>I</i>		10	11,5
<i>II</i>		52	59,8
<i>III</i>		25	28,7
Status axilar			
<i>0</i>		37	42,5
<i>1-3</i>		28	32,2
<i>>3</i>		22	25,3
Estádios Clínicos			
<i>I</i>		8	9,2
<i>II</i>		62	71,3
<i>III</i>		16	18,3
<i>IV</i>		1	1,2

Note que as amostras que aparecem de um lado na lâmina do TMA se repetem do outro. No entanto, essa segunda amostragem é proveniente de uma região diferente do bloco de parafina. As amostras duplicadas permitem a avaliação dos casos mesmo que em um dos lados não apresente material suficiente, como pode ser evidenciado na segunda coluna da segunda linha, por exemplo (foto 1).

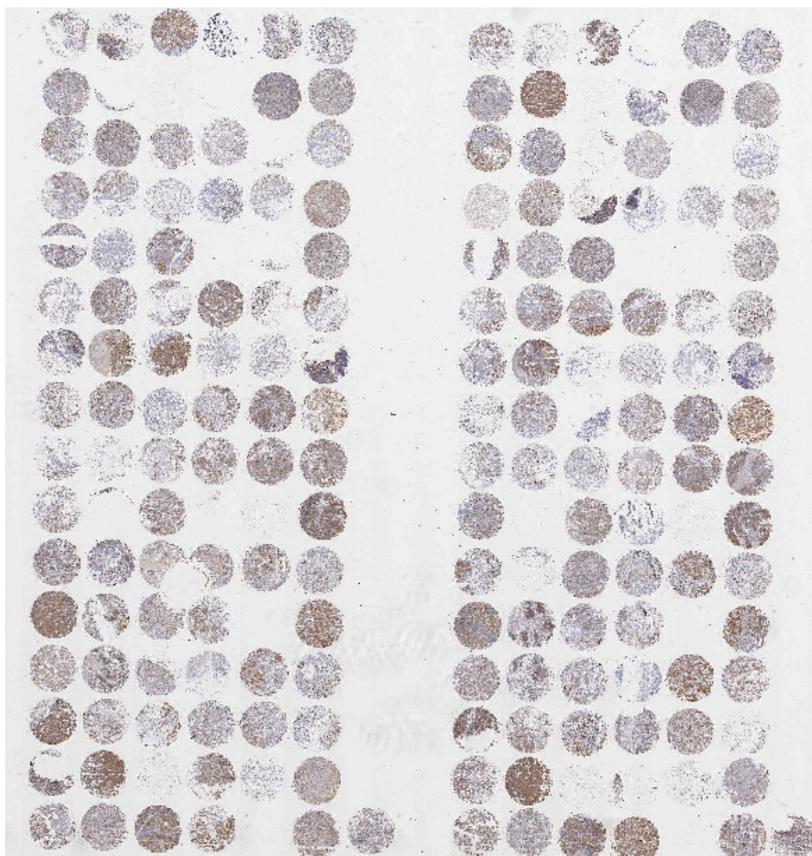


Foto 1: Fotomicrografia em pequeno aumento da lâmina de TMA marcada para WIPF2.

Após análise rigorosa, notou-se que das 96 amostras previamente selecionadas, uma era de câncer de mama apócrino e outra havia sido obtida após hormonioterapia neoadjuvante. Dessa forma, 94 casos na lâmina de TMA final preencheram os critérios de seleção e 87 casos puderam ser analisados adequadamente por apresentarem tecido tumoral em quantidade satisfatória para avaliação.

3.6. Imunohistoquímica para RE, RP, Ki-67, HER-2 e WIPF2

Foram preparadas lâminas feitas de acordo com a técnica de TMA acima descrita. Estas lâminas foram mantidas em estufa a 60° Celsius *overnight* e, posteriormente, desparafinizadas em xilol e rehidratadas em etanol e água destilada. Realizada a recuperação

antigênica, depois de colocadas as lâminas em suporte com tampão citrato (200ml/20 lâminas), em forno de micro-ondas por 7 minutos em potência máxima. Depois de esfriadas, as lâminas, foram secas em suas bordas e lavadas em PBS. Os seguintes anticorpos primários foram incubados *overnight* à temperatura ambiente: RE (1:100, clone 6F11, Novocasta, UK), RP (1:100, clone 1A6, Novocasta, UK), Ki-67 (1:100, clone MM1, Novocasta, UK), HER-2 (HercepTest, Dako, Denmark) e WIPF2 (1:10, clone Ab1, Sigma-Aldrich, US). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (Dako EnVision+ System – Anti-mouse Peroxidase) por 30 minutos e contra-coradas com hematoxilina de Harris, azulado com água amoniacal e desidratadas com álcoois. Todas as lâminas foram avaliadas por dois observadores. Os casos discordantes foram reavaliados em conjunto para definição da expressão.

3.7. Expressão de RE, RP, HER2 e Ki-67

A avaliação da expressão do RE, do RP e do antígeno Ki-67 nos tumores foi realizada com microscopia de luz em aumento de 100 a 400 vezes. As lâminas foram avaliadas por dois observadores e os casos discordantes foram reavaliados em conjunto e chegou a um consenso final.

Para os receptores hormonais, foram considerados casos positivos onde mais de 10% das células tumorais estavam com seus núcleos francamente corados (Harvey et al., 1999; Fitzgibbons et al., 2000; Anelli et al., 2003; Bilous et al., 2003; Kourea et al., 2003). A foto 2 exemplifica casos de carcinoma ductal invasivo da mama com expressão negativa para RE (2A), positiva para RE (2B), negativa para RP (2C) e positiva para RP (2D).

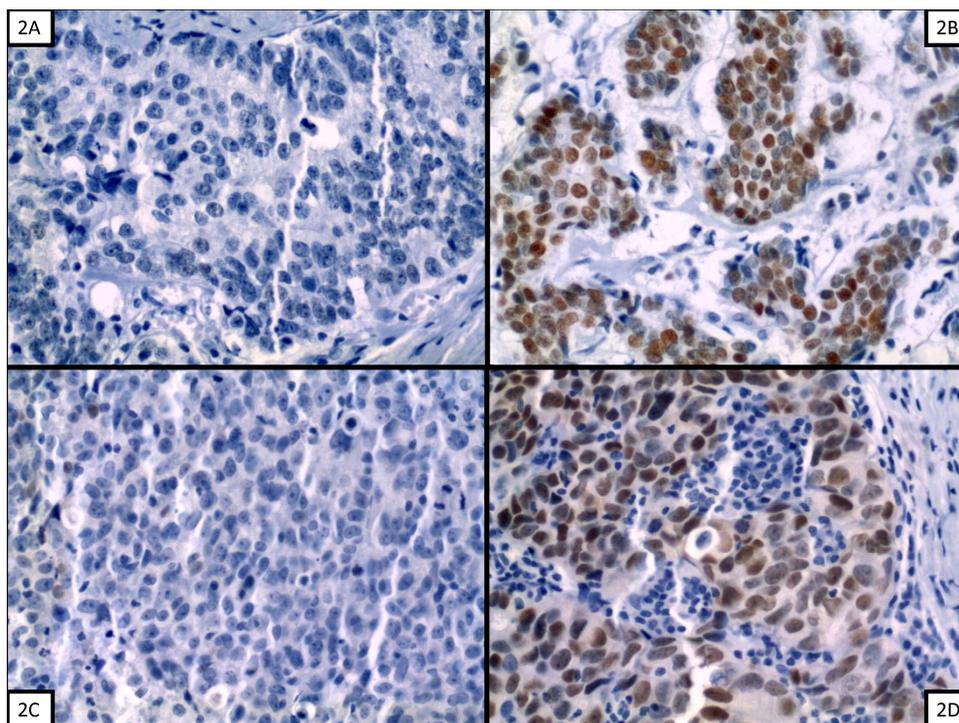


Foto 2: Fotomicrografias de casos representativos, no TMA, referentes a reações imunohistoquímicas. **2A:** negativa para receptores de estrogênio (RE); **2B:** positiva para RE; **2C:** negativa para receptor de progesterona (RP); **2D:** positiva para RP (microscopia de luz; 400x).

A imunorreatividade da proteína HER2 foi determinada pela marcação de membrana celular e categorizada entre 0 e 3+. A categoria 0 foi definida pela não detecção de marcação de membrana ou pela marcação em menos de 10% das células neoplásicas. A categoria 1+ foi definida pela tênue e mal definida marcação de membrana em mais de 10% das células neoplásicas. A categoria 2+ foi definida pela observação de fraca a moderada marcação completa de membrana em mais de 10% das células tumorais e a categoria 3+, definida pela marcação intensa da membrana em mais de 30% das células tumorais. Foram considerados positivos tumores categorizados como 3+ (Jacobs et al., 1999a; b; Bilous et al., 2003). Essa classificação é baseada no protocolo HercepTest e a foto 3 exemplifica resultados de reações imunohistoquímicas para a expressão da proteína HER-2.

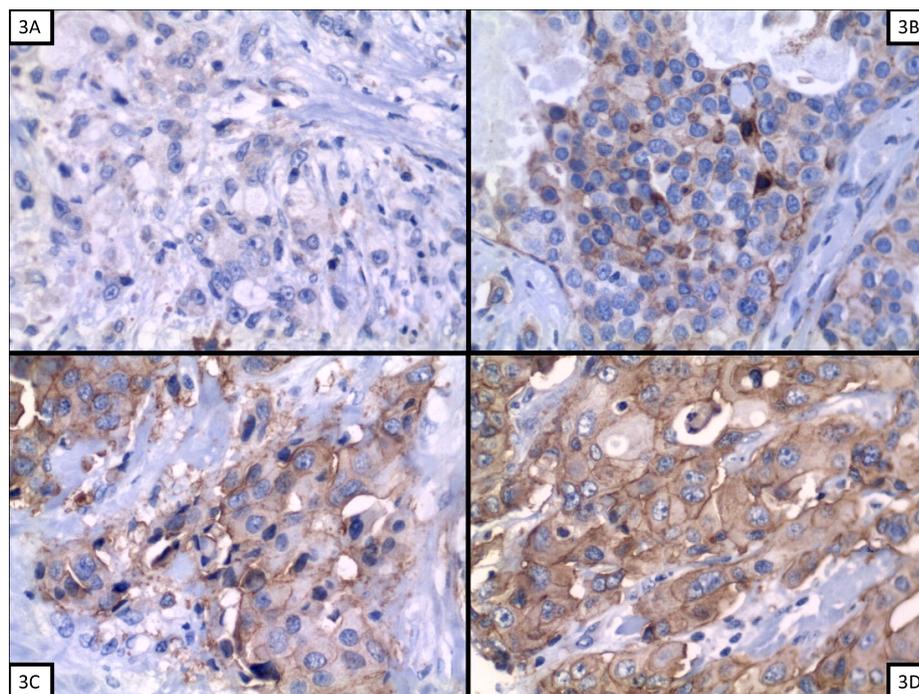


Foto 3: Fotomicrografias de casos representativos, no TMA, referentes a reações imunohistoquímicas para HER2. **3A:** reação negativa (0); **3B:** reação negativa (1+); **3C:** reação inconclusiva (2+); **3D:** reação positiva (3+) (microscopia de luz; 400x).

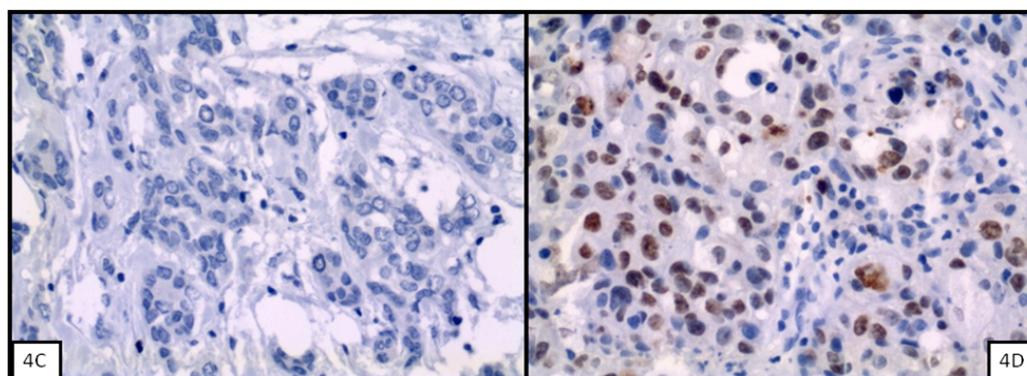


Foto 4: Fotomicrografias de casos representativos, no TMA, referentes a reações imunohistoquímicas. **4A:** reação negativa para antígeno Ki-67; **4B:** reação positiva para antígeno Ki-67. As marcações para Ki-67 apresentam-se como coloração em tom marrom no núcleo (microscopia de luz; 400x).

O Ki-67 apresentou pouca marcação nas lâminas do TMA, na microscopia óptica, sendo que, para diferenciar em dois grupos com marcações diferentes, convencionou-se adotar marcações maiores que 1% das células tumorais como positivas (Figuras 4A e 4B).

3.8. Expressão da proteína WIPF2

A marcação imunohistoquímica para WIPF2 foi realizada nas lâminas de TMA e classificada, empiricamente, de acordo com a intensidade e porcentagem de células marcadas, considerando que a marcação deveria ser citoplasmática, devido à localização da proteína.

Dessa forma, convencionou-se adotar quatro marcações possíveis: nenhuma marcação (0), marcação fraca em menos de 50% das células tumorais (1+), marcação fraca em mais de 50% das células ou forte em menos de 50% das células (2+) ou marcação forte em mais de 50% das células (3+) (Foto 5). Após avaliação do tecido mamário normal, com marcação que pode chegar a 2+, consideraram-se positivos somente os casos WIPF2 3+ (Foto 6). Obteve-se de acordo com a marcação para WIPF2: 5 casos 0+, 14 casos 1+, 32 casos 2+ e 36 casos 3+, constituindo 36 casos positivos e 51 casos negativos.

3.9. Análise digital de Ki-67

Através da aquisição de imagem digital utilizando-se o software Spectrum Version 10.2.2.2317, Aperio Technologies, Inc. foi possível a avaliação dos núcleos marcados para Ki-67 e esse valor foi expresso em porcentagem. Devido ao fato dessa marcação ser nuclear e o resultado de cada célula ser positivo ou negativo (a intensidade da marcação não influencia o resultado), a quantificação digital no TMA apresenta alta acurácia e reprodutibilidade (Kajdacsy-Balla et al., 2007).

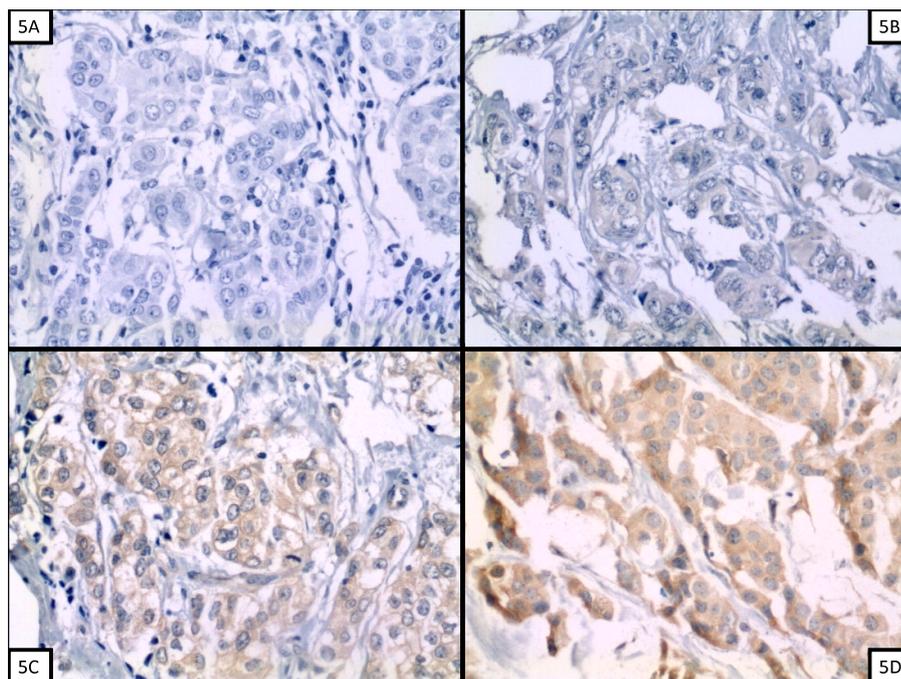


Foto 5: Fotomicrografias de casos representativos, no TMA, referentes a reações imunohistoquímicas para WIPF2; **5A:** reação negativa (0); **5B:** reação negativa (1+); **5C:** reação positiva fraca (2+); **5D:** reação positiva forte (3+) (microscopia de luz; 400x).

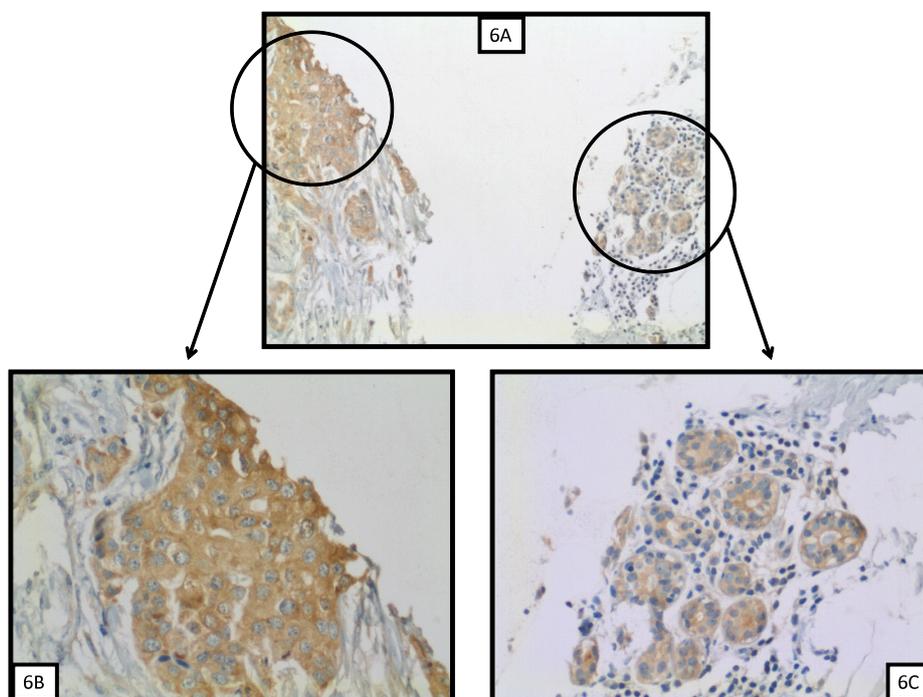


Foto 6: Fotomicrografias de casos representativos, no TMA, referentes a reações imunohistoquímicas para WIPF2; **6A:** Corte evidenciando, no mesmo campo, tecido tumoral WIPF 3+ (**6B**) e tecido mamário normal WIPF 2+ (**6C**). A marcação para WIPF2 apresenta-se como coloração marrom no citoplasma (microscopia de luz; 100x (6 A), 400x (6B, 6C)).

Os resultados foram expressos em porcentagem e, de acordo com revisão de literatura optou-se por considerar os casos acima de 13% como positivos, pois esse é um dos parâmetros usados para inferência do perfil molecular, como será descrito adiante, sendo utilizado para a diferenciação entre carcinoma de mama do tipo luminal A e luminal B (Cheang et al., 2009).

3.10. Análise digital do WIPF2

As imagens obtidas da lâmina com marcação imunohistoquímica para WIPF2 também foram analisadas, considerando-se que a marcação é citoplasmática e as células mamárias normais também expressam a proteína. Além da porcentagem de células tumorais marcadas, a intensidade da marcação também pode influenciar no resultado final, sendo que após distribuição pelo software em três intensidades diferentes (1+, 2+ e 3+), consideraram-se como células positivas somente as 3+.

Na análise digital do WIPF2 foi considerada a porcentagem de células tumorais positivas, ou seja, com marcação 3+, em cada amostra. Como a maioria dos casos pode ser amostrada em duplicata, considerou-se a média das duas amostras. A porcentagem média de positividade foi 16,2% com desvio padrão 9,4%.

3.11. Análise estatística

A análise de inter-relação entre os testes foi realizada para obtenção do índice kappa. As variáveis qualitativas foram analisadas em tabelas de contingência com o teste exato de Fisher, quando havia duas variáveis, ou com o teste qui-quadrado quando havia mais de duas variáveis para avaliação.

As análises de variáveis quantitativas contínuas foram realizadas com o teste t, quando tinham distribuição normal e com o teste de Wilcoxon, quando não tinham distribuição normal.

A análise de variáveis quantitativas contínuas entre grupos diferentes foi realizada através do método de controle de Donnut, utilizando-se um dos grupos como comparação. O *software* JMP SAS versão 7.1 foi utilizado para as análises estatísticas acima mencionadas. Significância estatística foi definida para $p < 0,05$.

3.12. Aspectos éticos

Esse estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP – USP, em sua 286^a. Reunião ordinária realizada em 11/05/2009 e enquadrado na categoria aprovado, de acordo com o processo no. 3815/2009 (Anexos).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da expressão gênica em cultura celular

A quantificação da expressão do gene do HER2 (ERBB2) revelou que a linhagem SKBR3 apresenta expressão 95 vezes maior do que a linhagem MCF7 ($p < 0,001$) (gráfico 1; tabela 2). Da mesma forma, ao se avaliar o gene WIPF2, notou-se que a linhagem SKBR3 tem expressão seis vezes maior do que a linhagem MCF7 ($p < 0,001$) (gráfico 2; tabela 2).

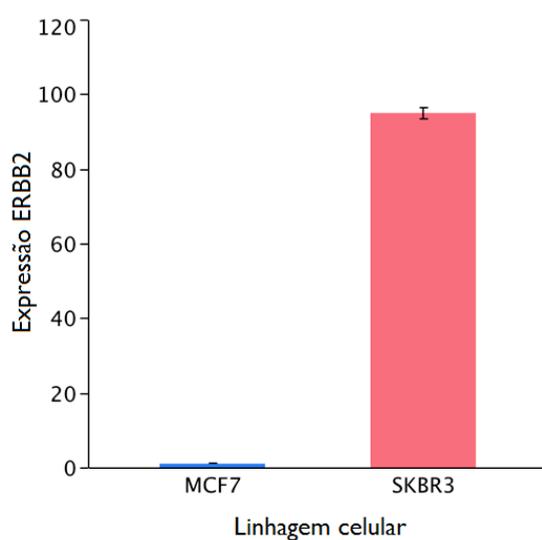


Gráfico 1: Avaliação da expressão média do gene ERBB2 na linhagem SKBR3 ($95,0 \pm 2,5$; $n=3$) em comparação com a linhagem MCF7 (1 ; $n=3$), considerada controle (experimento realizado em triplicata).

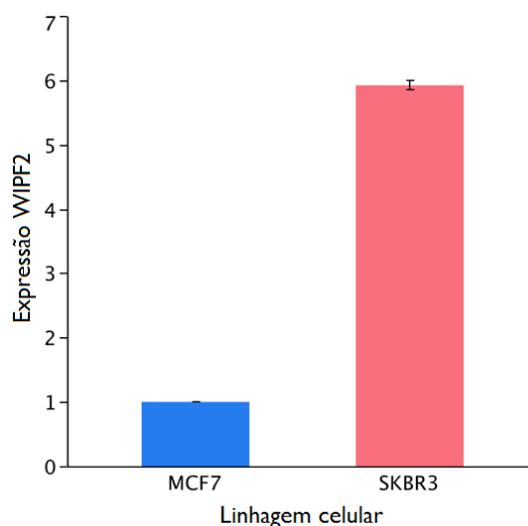


Gráfico 2: Avaliação da expressão média do gene WIPF2 na linhagem SKBR3 ($5,9 \pm 0,1$; $n=3$) em comparação com a linhagem MCF7 (1 ; $n=3$), considerada controle (experimento realizado em triplicata).

4.2. Validação do TMA como método para pesquisa em câncer de mama

Da seleção inicial de 94 casos, 87 casos (92,6%) puderam ser avaliados nas lâminas em que se realizou reação imunohistoquímica para receptor de estrógeno, receptor de progesterona e HER2, pois o fragmento retirado do bloco de parafina possibilitou amostragem de tecido tumoral em quantidade suficiente para análise. Os resultados dos exames anátomo-patológicos, emitidos à época em que ocorreu o tratamento dos casos selecionados, foram considerados na avaliação e os casos que tiveram divergência entre os LAP e a análise do TMA foram revisados.

Entre os 87 casos analisados, os receptores de estrogênio e progesterona estavam presentes ao exame anátomo-patológico em, respectivamente, 55 e 48 casos. Esses casos, quando avaliados através do método TMA, apresentaram positividade em 48 casos para receptor de estrógeno (87,3%) e em 41 casos para receptor de progesterona (85,4%) sendo que, nos dois casos, todas as amostras positivas no TMA eram positivas no LAP, não havendo casos falso-positivos.

O teste de correlação kappa entre as lâminas e o TMA foi de 83,5 (IC: 0,72-0,95) para RE e 84,0 (IC: 0,73-0,95) para RP. Essa diferença encontrada deve-se, principalmente, aos casos em que a positividade era focal, sendo que, na amostragem para o TMA, a área selecionada não representou as células que expressavam esses receptores.

O resultado do teste para o HER2 no laudo anátomo-patológico foi 3+ em 22 casos e 2+ em 3 casos. Nos casos duvidosos (2+) havia sido realizado teste CISH (*Cromogenic in situ hybridization*- Hibridização *in situ* cromogênica) para pesquisa da amplificação do gene ERBB2. Após esse teste, constatou-se somente um positivo entre os três casos 3+, concluindo que 23 tumores apresentavam superexpressão do HER-2.

Em relação à superexpressão do HER2, a marcação de lâminas obtidas através de TMA apresentou marcação menos intensa quando comparadas às lâminas confeccionadas na ocasião do diagnóstico, com técnica convencional. Dessa forma, houve 12 casos 3+ e 8 casos 2+, sendo que todos os casos 3+ no TMA eram 3+ no LAP e os casos 2+ no TMA eram 2+ ou 3+ no LAP. Dos 20 casos que apresentaram alguma marcação significativa para HER-2 (2+ ou 3+) no TMA correspondem a 80,0% dos 25 casos que apresentaram no LAP. Não houve nenhum caso falso-positivo.

4.3. Classificação do câncer de mama de acordo com o perfil molecular

Dentre os 87 casos analisados digitalmente, foram coletadas informações sobre o laudo anátomo-patológico (LAP) fornecido à época do tratamento e considerado como referência para as análises realizadas, pois, além da superfície tumoral analisada ser maior, geralmente o patologista dispunha de diferentes cortes para análise, originados de diferentes partes da peça cirúrgica.

Após realização de imunohistoquímica para Ki-67, esses tumores foram reclassificados em quatro subgrupos de carcinomas ductais da mama: luminais A: 32 casos (RE e/ou RP positivo; HER-2 e Ki-67 negativos), luminais B: 24 casos (RE e/ou RP positivo; HER-2 e/ou Ki-67 positivos), HER2: 9 casos (HER-2 positivo e RH negativos) e triplo-negativos: 22 casos (RH e HER-2 negativos) (tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos tumores de acordo com o perfil molecular. Valores expressos em número absoluto e porcentagem.

Perfil Molecular	No.(Porcentagem)
<i>Luminal A</i>	32 (37%)
<i>Luminal B</i>	24 (28%)
<i>HER2</i>	9 (10%)
<i>Triplo-negativo</i>	22 (25%)
Total	87 (100%)

4.4. Superexpressão do WIPF2 – Microscopia óptica

4.4.1. Análise do WIPF2 de acordo com o perfil molecular

Na microscopia óptica observou-se que a porcentagem dos casos de tumores perfil HER2 que apresentou superexpressão do WIPF2 foi significativamente maior do que a porcentagem no perfil triplo-negativo (66,7% vs. 22,7%; $p = 0,03$). Em relação ao perfil luminal A e ao perfil luminal B, os tumores HER2 apresentaram maior expressão do WIPF2, mas sem significância estatística (tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da expressão de WIPF2, por microscopia óptica, de acordo com o perfil molecular e comparação dos grupos com o tipo HER2. Valores expressos em número absoluto e porcentagem (teste exato de Fisher).

	<i>WIPF2 Positivo</i>	<i>WIPF2 Negativo</i>	<i>p</i>
<i>HER2</i>	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
<i>Luminal A</i>	15 (46,9%)	17 (53,1%)	0,18
<i>Luminal B</i>	10 (41,7%)	14 (58,3%)	0,14
<i>Triplo-negativo</i>	5 (22,7%)	17 (77,3%)	0,03

4.4.2. Análise do WIPF2 de acordo com o HER2

Quando avaliados os casos de superexpressão do WIPF2 de acordo com o HER2, através de microscopia óptica, encontrou-se 50% no grupo de pacientes com superexpressão do HER2 e 38% no grupo de pacientes sem superexpressão do HER2, não apresentando diferença estatística ($p=0,34$; teste exato de Fisher; tabela 5).

Tabela 5: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) no grupo sem superexpressão do HER2 (HER2-) e com superexpressão do HER2 (HER2+). Valor absoluto e porcentagem ($p=0,34$; teste exato de Fisher).

	HER2 -	HER2+	Total
WIPF2 -	38 (62%)	13 (50%)	51 (59%)
WIPF2+	23 (38%)	13 (50%)	36 (41%)
Total (%)	61 (70%)	26 (30%)	87 (100%)

4.4.3. Variáveis associadas à superexpressão do WIPF2

Diversas variáveis foram analisadas com a finalidade de se detectar associações com a superexpressão do WIPF2, estando relacionadas às pacientes (idade, status menopausal, paridade) ou relacionadas ao tumor (acometimento axilar, estadió clínico, grau de diferenciação, expressão de receptor de estrógeno, expressão de receptor de progesterona, expressão de Ki-67). A associação com essas variáveis estão listadas a seguir.

4.4.3.1. Idade

A média de idade (\pm desvio padrão) no grupo que apresentou superexpressão do WIPF2 foi $57,3 \pm 13,7$ anos, não apresentando diferença em relação à idade do grupo sem superexpressão WIPF2 ($53,9 \pm 13,4$ anos) ($p=0,26$; teste t; gráfico 3).

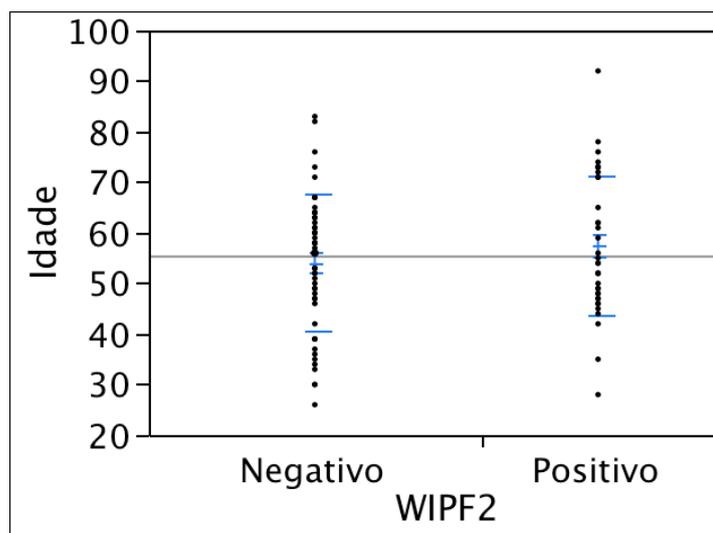


Gráfico 3: Distribuição da idade nos grupos sem superexpressão WIPF2 (WIPF2 negativo) e no grupo com superexpressão WIPF2 (WIPF2 positivo), $p=0,26$ (teste t).

4.4.3.2. Status menopausal

Não houve diferença entre os grupos de acordo com o status menopausal, sendo que a porcentagem de pacientes que apresentaram superexpressão do WIPF2 no grupo pós-menopausa (um ano após a última menstruação) e na pré-menopausa foi a mesma (41%) ($p=1,00$; teste exato de Fisher; tabela 6).

Tabela 6: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) no grupo pós e no grupo pré-menopausa. Valor absoluto e porcentagem ($p=1,00$; teste exato de Fischer).

	Pós- menopausa	Pré- menopausa	Total
WIPF2 –	17 (59%)	34 (59%)	51 (59%)
WIPF2 +	12 (41%)	24 (41%)	36 (41%)
Total	29 (33%)	58 (67%)	87 (100%)

4.4.3.3. Paridade

Em relação à paridade, a porcentagem de amostras com superexpressão WIPF2 no grupo de pacientes nuligestas foi significativamente maior em relação à porcentagem de amostras no grupo de pacientes não nuligestas (75,0% vs. 38%; $p=0,048$; teste exato de Fischer) (tabela 7).

Tabela 7: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) no grupo de não- nuligestas e no grupo de nuligestas. Valor absoluto e porcentagem ($p < 0,05$; teste exato de Fischer).

	Não Nuligestas	Nuligestas	Total
WIPF2 –	49 (62%)	2 (25%)	51 (59%)
WIPF2 +	30 (38%)	6 (75%)	36 (41%)
Total	79 (91%)	8 (9%)	87 (100%)

4.4.3.4. Acometimento axilar

A análise de acordo com o acometimento axilar mostrou superexpressão do WIPF2 em 38% do grupo sem linfonodos acometidos, 54% no grupo que apresentou de 1 a 3 linfonodos acometidos e 32% no grupo que apresentou 4 ou mais linfonodos acometidos, não havendo diferença entre os grupos ($p= 0,52$; teste qui-quadrado) (tabela 8).

Tabela 8: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) nos grupos sem acometimento linfonodal axilar (LN-), com acometimento de 1 a 3 linfonodos axilares (LN 1-3) ou com acometimento de 4 ou mais linfonodos (LN 4/+). Valor absoluto e porcentagem ($p= 0,25$; teste qui-quadrado).

	LN-	LN 1-3	LN 4/+	Total
WIPF2 –	23 (62%)	13 (46%)	15 (68%)	51 (59%)
WIPF2 +	14 (38%)	15 (54%)	7 (32%)	36 (41%)
Total	37 (43%)	28 (32%)	22 (25%)	87 (100%)

4.4.3.5. Estadio clínico

Em relação à superexpressão do WIPF2 nos diferentes estádios clínicos (EC), obteve-se: 50% no EC I, 32% no EC IIA, 56% no EC IIB, 44% no EC IIIA, 43% no EC IIIB e 100% no EC IV. A análise desses grupos não mostrou diferença significativa ($p=0,43$; teste qui-quadrado) (tabela 9).

Tabela 9: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) nos diversos estádios clínicos de câncer de mama. Valor absoluto e porcentagem ($p=0,43$; teste qui-quadrado).

	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	Total
WIPF2 –	4 (50%)	30 (68%)	8 (44%)	5 (56%)	4 (57%)	0 (0)	51 (59%)
WIPF2 +	4 (50%)	14 (32%)	10 (56%)	4 (44%)	3 (43%)	1 (100%)	36 (41%)

4.4.3.6. Grau de diferenciação

Em relação à superexpressão do WIPF2 nos diferentes graus de diferenciação, obteve-se: 60% no grau I, 38% no grau II e 40% no grau III. A análise desses grupos não mostrou diferença significativa ($p=0,44$; teste qui-quadrado) (tabela 10).

Tabela 10: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) nos diversos graus de diferenciação. Valor absoluto e porcentagem ($p=0,44$; teste qui-quadrado).

	I	II	III	Total
WIPF2 –	4 (40%)	32 (62%)	15 (60%)	51 (59%)
WIPF2 +	6 (60%)	20 (38%)	10 (40%)	36 (41%)
Total	10 (11%)	52 (60%)	25 (29%)	87 (100%)

4.4.3.7. Receptor de estrógeno (RE)

Quando avaliada a superexpressão do WIPF2 de acordo com a expressão de receptor de estrógeno, encontrou-se 38% de casos positivos no grupo com expressão de receptor de estrógeno (RE+) e 43% no grupo de pacientes sem expressão (RE-), não apresentando diferença estatística ($p=0,66$; teste exato de Fisher) (tabela 11).

Tabela 11: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) nos grupos com receptor de estrogênio negativo (RE-) ou receptor de estrogênio positivo (RE+). Valor absoluto e porcentagem ($p=0,66$; teste exato de Fisher).

	RE -	RE +	Total
WIPF2 -	21 (62%)	30 (57%)	51 (59%)
WIPF2 +	13 (38%)	23 (43%)	36 (41%)
Total	34 (59%)	53 (61%)	87 (100%)

4.4.3.8. Receptor de progesterona (RP)

Quando avaliada a superexpressão do WIPF2 de acordo com a expressão de receptor de progesterona, encontrou-se 40% no grupo com expressão de receptor de progesterona (RP+) e 43% no grupo de pacientes sem expressão de receptor de progesterona (RP-), não apresentando diferença estatística ($p=0,83$; teste exato de Fisher) (tabela 12).

Tabela 12: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) nos grupos com receptor de progesterona negativo (RP-) ou receptor de progesterona positivo (RP+). Valor absoluto e porcentagem ($p=0,83$; teste exato de Fisher).

	RP -	RP +	Total
WIPF2 -	24 (60%)	27 (57%)	51 (59%)
WIPF2 +	16 (40%)	20 (43%)	36 (41%)
Total	40 (46%)	47 (54%)	87 (100%)

4.4.3.9. Ki-67

Quando avaliada a superexpressão do WIPF2 de acordo com a expressão de Ki-67, observou-se que o grupo com Ki-67 positivo apresentou porcentagem significativamente maior de amostras WIPF2 positivas quando comparado ao grupo Ki-67 negativo (67% vs. 35%, respectivamente; $p = 0,02$; teste exato de Fisher) (tabela 13).

Tabela 13: Análise dos casos WIPF2 negativos (WIPF2-) e positivos (WIPF2+) nos grupos com negatividade para ki-67 (ki-67-) ou positividade (ki-67+). Valor absoluto e porcentagem ($p=0,02$; teste exato de Fischer).

	Ki-67 -	Ki-67 +	Total
WIPF2 -	45 (65%)	6 (33%)	51 (59%)
WIPF2 +	24 (35%)	12 (67%)	36 (41%)
Total	69 (79%)	18 (21%)	87 (100%)

4.5. Superexpressão do WIPF2 – Análise digital

4.5.1. Análise digital do WIPF2 de acordo com o perfil molecular

Foi realizada comparação da porcentagem de células que expressavam WIPF2 com marcação considerada 3+ nos tumores de acordo com o perfil molecular. O grupo HER2 ($23,9 \pm 9,0\%$; $n=9$) apresentou expressão do WIPF2 significativamente maior do que o grupo luminal A ($14,6 \pm 9,0\%$; $p=0,01$; $n=32$) e o grupo triplo-negativo ($14,2 \pm 9,0\%$; $p=0,01$; $n=22$). Apresentou uma tendência à maior expressão em relação ao grupo luminal B ($16,5 \pm 9,0\%$; $p=0,06$; $n=24$), sem significância estatística (gráfico 4).

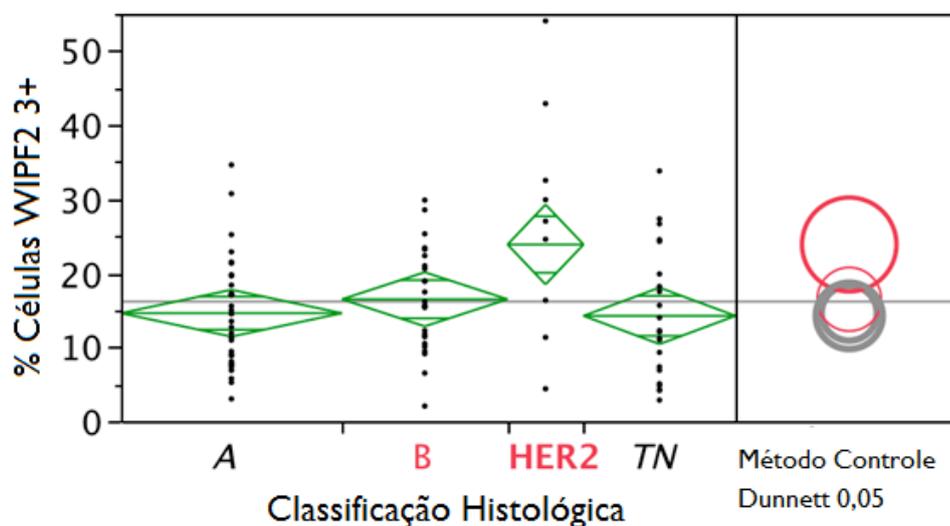


Gráfico 4: Distribuição da porcentagem de células tumorais marcadas para WIPF2 considerada 3+ em cada amostra, divididas nos grupos: luminal A (A), luminais B (B), HER2 positivos (HER2) e triplos-negativos (TN).

4.5.2. Análise digital de outras variáveis

O resultado da análise digital da expressão do WIPF2 foi relacionado com outras variáveis, como: expressão HER2, idade, status menopausal, paridade, acometimento axilar, estágio clínico, grau de diferenciação, expressão de receptores de estrogênio e progesterona e expressão Ki-67.

A expressão do WIPF2 foi analisada como variável quantitativa contínua e como variável qualitativa, considerando-se diversos pontos de referência para positividade. Em nenhuma dessas análises houve diferença estatística na expressão do WIPF2 entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

O emprego de diferentes técnicas para o estudo da expressão simultânea dos genes ERBB2 e WIPF2 foi importante para aumentar a confiabilidade dos resultados encontrados. Através da comparação da expressão gênica do WIPF2 em cultura de células SKBR3 (que apresenta o gene ERBB2 amplificado) em relação a células MCF7 (sem amplificação do ERBB2), verificou-se que a primeira apresentou expressão do WIPF2 seis vezes maior. Essa etapa foi muito importante no início do trabalho, pois o fato desse gene estar comprovadamente presente no amplicon em parte dos casos de câncer de mama estudados (Arriola et al., 2008) não significa que necessariamente deva estar superexpresso. Como demonstrado em estudo prévio, a sequência gênica mínima do amplicon ERBB2 contém 10 genes, mas a superexpressão pode ser constatada somente em seis (Kauraniemi et al., 2003). Dessa forma, pode-se constatar que, em células que apresentam o amplicon ERBB2, o gene WIPF2, além de amplificado, também é superexpresso.

Após a obtenção de amostras de câncer de mama em material armazenado em parafina, foram confeccionadas lâminas através da metodologia do TMA permitindo análise dos 94 casos selecionados em uma só lâmina. Em comparação com a técnica convencional (uma amostra por lâmina), o TMA apresentou-se como um bom método para pesquisa, pois representa de forma eficiente diversas áreas tumorais, permite repetição dos experimentos e estudo de grande número de amostras simultâneas, possibilitando o uso de menos reagentes, além de diminuir os custos e o tempo empregados no projeto (Andrade et al., 2007).

Os resultados encontrados em relação aos receptores de estrogênio e progesterona, com índice de correlação kappa de 0,83 e 0,84, respectivamente, comprovam os índices previamente encontrados na literatura e validam o método utilizado na realização de pesquisas e investigação de novos marcadores prognósticos. Da mesma forma, a porcentagem de casos que não foi possível a obtenção de amostras mostrou-se baixa, sendo que somente sete casos não puderam ser avaliados (7,4%) devido a não obtenção de tecido tumoral em nenhum dos

dois cortes e em sete casos (7,4%) foi possível a análise de somente um corte, o que não interferiu na qualidade da análise. Esses valores e correlações encontrados são condizentes com as porcentagens descritas em literatura quando se analisou a metodologia TMA no câncer de mama (Sapino et al., 2006).

Quando avaliados os subtipos tumorais, nota-se que a divisão dos subgrupos utilizando-se o Ki-67 torna a divisão mais específica, descrevendo-se grupos com prognósticos mais bem definidos, uma vez que esse marcador infere a atividade proliferativa celular (Cheang et al., 2009).

Em relação à hipótese inicial sobre a superexpressão simultânea do HER2 e do WIPF2, constatou-se que, na microscopia óptica, o grupo de tumores HER2 apresentou porcentagem maior de casos com superexpressão de WIPF2 em relação ao grupo triplo-negativo (66,7% vs. 22,7%, respectivamente; $p=0,03$). Quando a análise foi digital, constatou-se que o grupo HER2 apresentou maior expressão em relação aos grupos luminal A e triplo-negativo ($23,9 \pm 9,0\%$ vs. $14,6 \pm 9,0\%$ e $14,2 \pm 9,0\%$, respectivamente).

Considera-se que a análise digital apresente maior acurácia, por representar numericamente a intensidade da marcação e a porcentagem de células coradas. Dessa forma, considera-se que os tumores HER2 positivos devem apresentar maior expressão do WIPF2 devido à amplificação de todo o amplicon.

Outro fato que reforça a hipótese da superexpressão simultânea foi a constatação da tendência à uma maior expressão do WIPF2 nos tumores HER2 em relação ao grupo luminal B, mas sem significância estatística, pois no grupo luminal B também encontram-se tumores HER2 positivos.

A expressão simultânea não pode ser comprovada quando se considerou somente a expressão do HER2, tanto na microscopia óptica quanto na análise digital. Esse achado pode se relacionar ao fato de que o amplicon presente em tumores HER2 (que não expressam

receptores hormonais) possa ser diferente daquele presente nos tumores luminais B (que expressam receptores hormonais). Esse fato faria com que ao se analisar todos os casos de HER2 positivos como um só grupo, pode não ser possível a constatação da diferença na expressão do WIPF2. Por outro lado, quando esses grupos foram divididos pelo perfil molecular, a microscopia óptica e a análise digital evidenciaram uma maior expressão no perfil HER2. Esse amplicon diferente, com mais genes relacionados à invasão tumoral poderia ser um dos responsáveis pelo pior prognóstico do perfil HER2 em relação ao perfil luminal B (Cheang et al., 2009).

A análise na microscopia óptica também encontrou relação direta entre os casos que apresentaram Ki-67 positivo (antígeno relacionado à proliferação celular) e a superexpressão do WIPF2. Dessa forma, pode-se inferir que esses tumores WIPF2 positivos são em grande parte tumores HER2 positivos, que costumam ser menos diferenciados e com maior índice de proliferação (Wirapati et al., 2008).

Ainda na microscopia óptica, observou-se maior porcentagem de casos que superexpressaram o WIPF2 no grupo de nulíparas em relação ao grupo de mulheres não-nulíparas, tornando-o talvez um novo marcador diferencial no câncer de mama em mulheres que não tiveram gestação a termo. As alterações mamárias promovidas pela gestação estão relacionadas a mudanças no epitélio com surgimento de células com menor proliferação e, conseqüentemente, menor suscetibilidade a transformações malignas (Russo et al., 1991; Russo e Russo, 1995). Também foi descrito o pior prognóstico do câncer de mama na mulher nuligesta (Anderson et al., 2004), sendo que a superexpressão do WIPF2 poderia ser um dos fatores associados à maior agressividade tumoral.

Quando se analisou a superexpressão do WIPF2 associada a outras variáveis, como idade, status menopausal, paridade, acometimento metastático axilar, estadió clínico, grau de

diferenciação, expressão de RE e de RP não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Através desse estudo, realizado com diferentes metodologias para a análise da marcação imunohistoquímica do WIPF2 constatou-se a associação da maior expressão dessa proteína com tumores perfil HER2, tumores Ki-67 positivo e tumores em mulheres nuligestas. Esses resultados permitem considerar o WIPF2 como um fator prognóstico em potencial, sendo que mais estudos devem ser realizados para a elucidação da sua importância no câncer de mama.

Dessa forma, a melhor avaliação do gene WIPF2, através da quantificação de cópias por célula tumoral, assim como a quantificação de sua expressão através de PCR-RT, que será realizada em estudos futuros, possibilitará uma melhor análise da sua participação nos tumores de acordo com o perfil molecular. Além disso, o acompanhamento da sobrevida das pacientes no grupo de tumores WIPF2 positivos também possibilitará a análise de sua importância como fator prognóstico.

6. CONCLUSÕES

- A superexpressão simultânea dos genes WIPF2 e ERBB2 foi comprovada na linhagem celular SKBR3.

- A metodologia de TMA foi validada para a pesquisa no câncer de mama, após avaliação da expressão de receptores de estrógeno e progesterona e comparação com lâminas convencionais.

- Através da microscopia óptica pode ser evidenciado que tumores do grupo Ki-67 positivo e do grupo de pacientes nuligestas se relacionam com maior porcentagem de casos considerados WIPF2 positivos.

- O perfil HER2 apresentou maior porcentagem de casos com superexpressão do WIPF2 em comparação com o perfil triplo-negativo na microscopia óptica.

- Na análise digital, a expressão do WIPF2 no câncer de mama perfil HER2 foi significativamente maior em comparação ao perfil triplo-negativo e ao perfil luminal A.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, P. R., A. L. Hanlon, *et al.* Parity confers better prognosis in older women with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy. Clin Breast Cancer, v.5, n.3, Aug, p.225-31. 2004.

Andrade, V. P., I. W. Da Cunha, *et al.* Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. J Bras Patol Med Lab, v.43, n.1, p.55-60. 2007.

Anelli, A., R. R. Brentani, *et al.* Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. Ann Oncol, v.14, n.3, Mar, p.428-32. 2003.

Arriola, E., C. Marchio, *et al.* Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. Lab Invest, v.88, n.5, May, p.491-503. 2008.

Aspenstrom, P. The WASP-binding protein WIRE has a role in the regulation of the actin filament system downstream of the platelet-derived growth factor receptor. Exp Cell Res, v.279, n.1, Sep 10, p.21-33. 2002.

Bilous, M., M. Dowsett, *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. Mod Pathol, v.16, n.2, Feb, p.173-82. 2003.

Bilous, M., A. Morey, *et al.* Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. Pathology, v.38, n.2, Apr, p.120-4. 2006.

Cheang, M. C., S. K. Chia, *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst, v.101, n.10, May 20, p.736-50. 2009.

Debnath, J. e J. S. Brugge. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. Nat Rev Cancer, v.5, n.9, Sep, p.675-88. 2005.

Disanza, A., A. Steffen, *et al.* Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. Cell Mol Life Sci, v.62, n.9, May, p.955-70. 2005.

EZTNM for the AJCC cancer staging manual. New York: Springer-Verlag: 1 CD-ROM p. 2003.

EZTNM for the AJCC cancer staging manual. New York: Springer-Verlag, v.1. 2003

Fitzgibbons, P. L., D. L. Page, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med, v.124, n.7, Jul, p.966-78. 2000.

Fritz, P., C. M. Cabrera, *et al.* c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. Breast Cancer Res, v.7, n.3, p.R374-84. 2005.

Gehmert, S., L. Prantl, *et al.* Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR-beta signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun, Jul 10. 2010.

Genomes, K. K. E. O. G. A. Regulation of actin cytoskeleton - Homo sapiens (human) 2010.

Grunert, S., M. Jechlinger, *et al.* Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. Nat Rev Mol Cell Biol, v.4, n.8, Aug, p.657-65. 2003.

Gusterson, B. A., R. D. Gelber, *et al.* Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. J Clin Oncol, v.10, n.7, Jul, p.1049-56. 1992.

Harvey, J. M., G. M. Clark, *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol, v.17, n.5, May, p.1474-81. 1999.

Hay, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. Acta Anat (Basel), v.154, n.1, p.8-20. 1995.

Jacobs, T. W., A. M. Gown, *et al.* Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. J Clin Oncol, v.17, n.7, Jul, p.1974-82. 1999a.

_____. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol, v.17, n.7, Jul, p.1983-7. 1999b.

Jarvinen, T. A. e E. T. Liu. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.78, n.3, Apr, p.299-311. 2003.

Jechlinger, M., A. Sommer, *et al.* Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. J Clin Invest, v.116, n.6, Jun, p.1561-70. 2006.

Kajdacsy-Balla, A., J. M. Geynisman, *et al.* Practical aspects of planning, building, and interpreting tissue microarrays: the Cooperative Prostate Cancer Tissue Resource experience. J Mol Histol, v.38, n.2, May, p.113-21. 2007.

Kang, Y. e J. Massague. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. Cell, v.118, n.3, Aug 6, p.277-9. 2004.

Kato, M. e T. Takenawa. WICH, a member of WASP-interacting protein family, cross-links actin filaments. Biochem Biophys Res Commun, v.328, n.4, Mar 25, p.1058-66. 2005.

Kauraniemi, P., T. Kuukasjarvi, *et al.* Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. Am J Pathol, v.163, n.5, Nov, p.1979-84. 2003.

Kourea, H. P., A. K. Koutras, *et al.* Expression of the cell cycle regulatory proteins p34cdc2, p21waf1, and p53 in node negative invasive ductal breast carcinoma. Mol Pathol, v.56, n.6, Dec, p.328-35. 2003.

Kurusu, S. e T. Takenawa. The WASP and WAVE family proteins. Genome Biol, v.10, n.6, p.226. 2009.

Larsimont, D., A. Di Leo, *et al.* HER-2/neu evaluation by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast cancer: implications for daily laboratory practice. Anticancer Res, v.22, n.4, Jul-Aug, p.2485-90. 2002.

Lee, J. M., S. Dedhar, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol, v.172, n.7, Mar 27, p.973-81. 2006.

Murthy, S. K., A. M. Magliocco, *et al.* Copy number analysis of c-erb-B2 (HER-2/neu) and topoisomerase IIalpha genes in breast carcinoma by quantitative real-time polymerase chain reaction using hybridization probes and fluorescence in situ hybridization. Arch Pathol Lab Med, v.129, n.1, Jan, p.39-46. 2005.

Pauletti, G., W. Godolphin, *et al.* Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene, v.13, n.1, Jul 4, p.63-72. 1996.

Pires, A. R., M. Andreiuolo Fda, *et al.* TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. Diagn Pathol, v.1, p.14. 2006.

Russo, I. H., M. Koszalka, *et al.* Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis. Br J Cancer, v.64, n.3, Sep, p.481-4. 1991.

Russo, J. e I. H. Russo. The etiopathogenesis of breast cancer prevention. Cancer Lett, v.90, n.1, Mar 23, p.81-9. 1995.

Sapino, A., C. Marchio, *et al.* Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. Virchows Arch, v.449, n.3, Sep, p.288-96. 2006.

Small, J. V., T. Stradal, *et al.* The lamellipodium: where motility begins. Trends Cell Biol, v.12, n.3, Mar, p.112-20. 2002.

Tanner, M., J. Isola, *et al.* Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. J Clin Oncol, v.24, n.16, Jun 1, p.2428-36. 2006.

Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer, v.2, n.6, Jun, p.442-54. 2002.

Tiezzi, D. G., J. M. Andrade, *et al.* HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. BMC Cancer, v.7, p.36. 2007.

Tiezzi, D. G., S. V. Fernandez, *et al.* Epithelial mesenchymal transition during the neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogen. Int J Oncol, v.31, n.4, Oct, p.823-7. 2007.

Usha, L., B. Tabesh, *et al.* Topoisomerase II alpha gene copy loss has adverse prognostic significance in ERBB2-amplified breast cancer: a retrospective study of paraffin-embedded tumor specimens and medical charts. J Hematol Oncol, v.1, p.12. 2008.

Wheelock, M. J. e K. R. Johnson. Cadherins as modulators of cellular phenotype. Annu Rev Cell Dev Biol, v.19, p.207-35. 2003.

Wiesner, F. G., A. Magener, *et al.* Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. Breast, v.18, n.2, Apr, p.135-41. 2009.

Wirapati, P., C. Sotiriou, *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, v.10, n.4, p.R65. 2008.

Wolff, A. C., M. E. Hammond, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol, v.25, n.1, Jan 1, p.118-45. 2007.

Yang, J., S. A. Mani, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell, v.117, n.7, Jun 25, p.927-39. 2004.

ANEXOS

ESTADIAMENTO

O sistema utilizado no HCRP - USP é o empregado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que é baseado na avaliação clínica do tamanho do nódulo, *status* dos linfonodos regionais e a presença de metástase à distância, sistema este conhecido como TNM.

O AJCC realizou revisão em Janeiro de 2003 no Manual de Estadiamento do Câncer (6° edição) onde algumas alterações importantes a respeito do câncer de mama foram implementadas. Segue abaixo o estadiamento atual (EZTNM for the AJCC cancer staging manual, 2003).

American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System For Breast Cancer

Tumor Primário (T)

A definição para classificação do tumor primário (T) segue a mesma classificação clínica e patológica. Se a mensuração for feita através do exame físico, o examinador usará letras maiúsculas (T1, T2 ou T3). Se a mensuração for realizada através de outro método (mamografia, ultra-sonografia, histologia), o examinador deverá notificar (pT1, mT1).

TX – o tumor primário não pode ser avaliado

T0 – sem evidência de tumor primário

Tis – carcinoma *in situ*

Tis (CDIS) – carcinoma ductal *in situ*

Tis (CLIS) – carcinoma lobular *in situ*

Tis (Paget) – doença de Paget do mamilo sem tumor

Nota: a doença de Paget associada à tumor invasivo deve ser classificada de acordo com o tamanho da lesão

T1 – tumor ≤ 2 cm em seu maior diâmetro

T1mic – microinvasão (≤ 1 mm em sua maior dimensão)

T1a – tumor > 1 mm e ≤ 5 mm

T1b – tumor > 5 mm e ≤ 10 mm

T1c – tumor > 10 mm e $\leq 2,0$ cm

T2 – tumor $> 2,0$ cm e $\leq 5,0$ cm

T3 – tumor $> 5,0$ cm

T4 – tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede torácica ou pele, como descrito a seguir:

T4a – extensão para parede torácica (não inclui o músculo peitoral)

T4b – edema (incluindo peau d’orange) ou ulceração da pele ou nódulos satélites confinados a mesma mama

T4c – T4a + T4b

T4d – carcinoma inflamatório

Linfonodos Regionais (N)

Avaliação clínica

NX – linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex.: previamente removidos)

N0 – sem metástases em linfonodos regionais

N1 – metástase para linfonodo(s) axilar móvel ipsilateral

N2 – metástase em linfonodo(s) axilar ipsilateral fixo ou coalescentes, linfonodos da mama interna ipsilateral *cl clinicamente aparente** na ausência de evidência clínica de metástase para linfonodos axilares ipsilaterais.

N2a - metástase em linfonodos(s) axilar ipsilateral fixo ou coalescentes

N2b – metástase *cl clinicamente aparente** para linfonodos da mama interna ipsilateral na ausência de evidência clínica de metástase para linfonodos axilares ipsilaterais

N3 – metástase para linfonodo infraclavicular ipsilateral com ou sem envolvimento de linfonodos axilares, ou em metástase *cl clinicamente aparente** para linfonodos da mama interna ipsilateral e presença de evidência clínica de metástase para linfonodos axilares ipsilaterais; ou metástase para linfonodo supraclavicular ipsilateral com ou sem envolvimento de linfonodos axilares ou de mama interna.

N3a – metástase para linfonodo infraclavicular ipsilateral

N3b – metástase em linfonodo da mama interna ipsilateral e linfonodo(s) axilar

N3c – metástase para linfonodo supraclavicular ipsilateral

*Clinicamente aparente é definido por detecção em estudos de imagem (excluindo linfocintilografia) ou por exame físico ou por visualização macroscópica.

Avaliação patológica (pN)^a

pNX – linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex.: previamente removidos ou não removidos para estudo histológico)

pN0 – ausência de metástase para linfonodos regionais ao à histologia, sem exame adicional para células tumorais isoladas

Nota: células tumorais isoladas são definidas como células tumorais únicas ou um aglomerado de células tumorais não maiores que 2mm, frequentemente detectadas por imunohistoquímica (IHQ) ou métodos de biologia molecular.

pN0(i-) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, IHQ negativa

pN0(i+) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, IHQ positiva

pN0(mol-) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, achados moleculares negativos (RT-PCR)

pN0(mol+) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, achados moleculares positivos (RT-PCR)

^aA classificação é baseada na dissecação axilar com ou sem dissecação do linfonodo sentinela. Classificação baseada somente no linfonodo sentinela deve ser designada como tal (ex.: pN0(i+) (ls)).

^bRT-PCR: transcriptase reversa/reacção em cadeia de polimerase.

pN1 – metástase em 1 a 3 linfonodos, e/ou linfonodos da mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não *clanicamente aparente***

pN1mi – micrometástase (maior que 0,2mm, não mais que 2,0mm)

pN1a – metástase para 1 a 3 linfonodos axilares

pN1b – metástase para linfonodos da mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não *clanicamente aparente***

pN1c – metástase para 1 a 3 linfonodos axilares e em linfonodos da mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não *clanicamente aparente***

pN2 – metástase em 4 a 9 linfonodos axilares, ou em linfonodos da mama interna *clanicamente aparente** na ausência de metástase para linfonodos axilares

pN2a – metástase para 4 a 9 linfonodos axilares (pelo menos um depósito tumoral maior que 2,0mm)

pN2b – metástase para linfonodos da mama interna *clanicamente aparente** na ausência de metástase para linfonodos axilares

pN3 – Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares, ou em linfonodos infra-claviculares, ou em linfonodos *cl clinicamente aparentes** da mama interna ipsilateral na presença de 1 ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais do que 3 linfonodos axilares com metástase microscópica clinicamente negativa para linfonodos da mama interna; ou em linfonodos supra-claviculares ipsilaterais.

pN3a – metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um depósito tumoral maior que 2,0mm), ou metástase em linfonodos infra-claviculares

pN3b – metástase em linfonodos *cl clinicamente aparentes** da mama interna ipsilateral na presença de 1 ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais do que 3 linfonodos axilares com metástase microscópica para a mama interna detectada por dissecação de linfonodo sentinela porém *não clinicamente aparente***

pN3c – metástase para linfonodos supra-claviculares ipsilaterais

**Clinicamente aparente* é definido por estudos de imagem (excluindo linfo-cintilografia) ou por exame físico

** *Não clinicamente aparente* é definido pela não detecção por exames de imagem (excluindo linfo-cintilografia) ou exame físico

Metástase à distância (M)

MX – metástase à distância não pode ser avaliada

M0 – sem metástase à distância

M1 – metástase à distância

Grupamento de Estadiamento

Estádio 0	Tis N0 M0		T4 N2 M0
Estádio I	T1* N0 M0	Estádio IIIC	QualquerT N3 M0
Estádio IIA	T0 N1 M0	Estádio IV	QualquerT QualquerN M1
	T1* N1 M0		*T1 inclui T1mic
	T2 N0 M0		Nota: o estágio deve ser mudado se os estudos de imagem após a cirurgia revelar a presença de metástase, desde que estes sejam executados em 4 meses após o diagnóstico na ausência de doença progressiva e em paciente que não esteja sob quimioterapia neoadjuvante.
Estádio IIB	T2 N1 M0		
	T3 N0 M0		
Estádio IIIA	T0 N2 M0		
	T1* N2 M0		
	T2 N2 M0		
	T3 N1 M0		
	T3 N2 M0		
Estádio IIIB	T4 N0 M0		
	T4 N1 M0		



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 13 de maio de 2009

Ofício nº 1415/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado “**O AMPLICON 17q12-q21: AMPLIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS GENES Her2, HOXB7 E WIPF2**” foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 286ª Reunião Ordinária realizada em 11/05/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 3815/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
FRANKLIN FERNANDES PIMENTEL
DR. DANIEL GUIMARÃES TIEZZI
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia