Fabiana Baroni Alves Makdissi

**Influência do microambiente no
prognóstico do câncer de mama**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Makdissi, Fabiana Baroni Alves

Influência do microambiente no prognóstico do câncer de mama / Fabiana Baroni Alves Makdissi. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Neoplasias de mama 2.Neoplasias de mama/classificação
3.Receptores estrogênicos 4.Células estromais 5.Fibroblastos 6.Microambiente
tumoral 7.Expressão gênica 8.Processos do sistema imunológico

USP/FM/DBD-421/13

"Os momentos que mais nos desafiam, nos definem."

Deena Kastor

Dedicatória

Ao meu marido Fabio,
a quem admiro, respeito e amo loucamente!
A quem agradeço fazer parte de mim nos momentos de felicidades, tristezas
ou conquistas.
E aos meus filhos Eduardo e Gustavo presentes de Deus em minha vida e
fontes de minha certeza de que este mundo caminha para um futuro
melhor...

Agradecimentos

**Aos meus pais Ary e Cleodete
a quem devo minha existência, meu amor
pela vida e minha insistência por
conquistar o mundo!**

**Aos meus sogros, Jean e Marina,
companheiros importantes e
inspiração para o trabalho diário
com amor e a preservação da
família.**

**À toda família: meu irmão Junior,
meus cunhados, sobrinhos,
tios, pelo delicioso convívio, o
que nos dá forças para seguir
em frente com a grata sensação
de que não estamos sós.**

À Professora Doutora Maria Aparecida de Azevedo Koike Folgueira, minha orientadora, por todo estímulo, orientação, e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Mitzi Brentani pesquisadora incansável, que não se conforma em não saber... A quem agradeço a atenção, a disponibilidade, os ensinamentos e a quem deixo uma pequena homenagem:

A menina tinha os cabelos louros.

A boneca também.

A menina tinha os olhos castanhos.

Os da boneca eram azuis.

A menina gostava loucamente da boneca.

A boneca ninguém sabe se gostava da menina.

Carlos Queirós

Às amigas do laboratório de oncologia experimental - LIM24, Maria Lucia Katayama, Rosimeire Roela, Maria Cristina Grandal, pelo profissionalismo, dedicação e valioso auxílio, imprescindíveis na elaboração deste trabalho.

À secretária Maria José Gonçalves Benevides e secretário Luiz pelo grande auxílio.

À Mabel Pinilla, Carlos Nascimento, Ivanildo Neves, Severino Ferreira e Alex Fiorini de Carvalho, funcionários e amigos do A.C.Camargo Cancer Center, que tiveram participação fundamentais na elaboração e finalização deste trabalho.

Aos médicos patologistas Antônio Hugo, Victor Piana de Andrade, Cynthia Osório, e Fernando Augusto Soares, pelo auxílio e disponibilidade inestimáveis no decorrer da realização deste trabalho.

Aos colegas médicos do Departamento de Mastologia do A.C.Camargo Cancer Center, do qual eu fazia parte no início deste trabalho, pelo conhecimento adquirido e que será levado comigo para sempre.

Ao Dr Mario Mourão Netto, amigo, ex chefe e grande incentivador de minha entrada na vida acadêmica.

À minha amiga Solange Torchia Carvalho que me acompanha no trabalho, me dá força e estímulo. Parceria indispensável!

Às amigas Maria Isabel Waddington Achatz e Amanda França, que abriram as portas da "sua casa" e me auxiliaram de forma carinhosa e fundamental para a finalização deste trabalho.

À Suely Francisco, bibliotecária do A.C.Camargo Cancer Center pela grande amizade e inestimável auxílio na realização da formatação final desta tese.

À Adalquíria, minha secretária pelo apoio, principalmente ao final deste trabalho quando seu carinho e atenção com minhas pacientes foram fundamentais para que eu pudesse estudar tranquila.

Às minhas amigas queridas Luciana Brincalepe, Patrícia Xander, Elisa Cordeiro, e minha babá Lourdes, cujo carinho com meus filhos e amizade por mim tornaram meu caminho mais sereno e só assim possível.

Ao patrocínio financeiro da FAPESP (projeto 09/10088-7) sem o qual este trabalho não seria possível.

Ao Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, de onde as amostras foram retiradas para a realização deste trabalho.

E finalmente, o agradecimento sincero, profundo e cheio de respeito à todas as mulheres que tiveram o diagnóstico de câncer de mama, e que com grandeza ofereceram aquilo que lhes causou dor para ser estudado e poder ajudar o próximo.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	x
Lista de figuras	xi
Lista de gráficos.....	xiii
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de quadros	xv
Resumo	xvi
Abstract.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 PACIENTES E MÉTODOS	18
3.1 Casuística para o <i>microarray</i>	18
3.2 Casuística para o TMA	20
3.3 Microdissecção a laser (LCM)	23
3.4 Extração e amplificação de RNA de material proveniente de microdissecção a laser	26
3.5 Análise estatística dos dados do Microarray	29
3.6 Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	30
3.7 Construção do <i>Tissue Microarray</i>	32
3.8 Protocolo Automatizado da Imunoistoquímica: Ventana	34
3.9 Utilização e Leitura da Imunoistoquímica	35
3.10 Análise Estatística	37
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Fenotipagem do microambiente (nos casos do <i>microarray</i>).....	39

4.2	Perfil da expressão gênica de células estromais de pacientes com câncer de mama.....	41
4.3	Validação técnica	45
4.4	Validação biológica.....	52
4.4.1	Casuística.....	52
4.4.2	Caracterização fenotípica de fibroblastos estromais de câncer de mama: expressão de AML, S100A4 e, CAV1 (TMA).....	58
4.4.3	Análise dos marcadores estromais (AML, S100A4 e CAV1) expressos por TMA.....	63
4.5	Expressão protéica de ZAP70 nas células estromais.....	73
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÃO	94
7	ANEXOS	96
8	REFERÊNCIAS.....	102

APÊNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	microlitro
µm	micrômetro
AML	α actina de músculo liso
CAFs	fibroblastos associados ao tumor
CAV1	caveolina 1
cDNA	DNA complementar
CK	citoceratinas
CK	citoqueratina
CY3	cianina 3
CY5	cianina 5
FDR	false discovery rate
GH	grau histológico
GN	grau nuclear
HER-2	proteína c-erbB-2
HGF	hepatocyte growth factor
HS	histoscore
IIQ	imunoistoquímica
IIQ	imunoistoquímica
ITGAM	integrina
Ki67	proteína Ki67 (marcador de proliferação)
LCM	microdissecção à laser
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCF10A	linhagem de mama normal
MDA-MB231	linhagem celular de câncer de mama
MEC	matriz extracelular
ng	nanograma
pg	picograma
RE	receptores de estrógeno
RNase	ribonuclease
RP	receptor de progesterona
S100A4	proteína
SAM	significance analysis of microarray
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
TGFβ	transforming growth factor beta
TMA	<i>tissue microarray</i> (“array de tecido”)
WNT	via de sinalização

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto Ilustrativa do Aparelho de Microdissecção: ArcturusXT™ Microdissection System.....	24
Figura 2	Áreas de tecido estromal de câncer de mama selecionadas para microdissecção.	25
Figura 3	Equipamento manual para construção dos <i>Tissue Microarrays</i>	31
Figura 4	Construção do TMA.....	33
Figura 5	Estroma em câncer de mama.....	40
Figura 6	Dendograma de amostras estromais de câncer de mama luminal.	42
Figura 7	Processos biológicos enriquecidos em genes diferencialmente expressos entre células estromais de tumores luminal.....	45
Figura 8	Expressão de CD20 e CD68 em câncer de mama.	48
Figura 9	Expressão de CD20, CD68 e Vimentina em câncer de mama Luminal B.....	49
Figura 10	Expressão de CD3 em linfócitos T de câncer de mama Luminal A e Luminal B.....	50
Figura 11	Expressão de ZAP70 em células do sistema imune de amostras de câncer de mama.....	51

Figura 12	Expressão de Ki67 em câncer de mama.....	53
Figura 13	Expressão de actina de músculo liso em fibroblastos estromais de câncer de mama.....	60
Figura 14	Expressão de S100A4 nos fibroblastos do estroma de câncer de mama luminal.....	61
Figura 15	Expressão de CAV1 em fibroblastos do estroma de câncer de mama luminal.....	62
Figura 16	Distribuição tridimensional dos tumores de acordo com a expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais.....	65
Figura 17	Dendograma da distribuição dos tumores luminais A e B segundo a expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Idade das pacientes dos grupos de TMA e microarray.....	56
Gráfico 2	Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama Luminal A e Luminal B.....	64
Gráfico 3	Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao grau histológico (SBR dos tumores)	67
Gráfico 4	Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao grau nuclear dos tumores.....	68
Gráfico 5	Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao comprometimento linfonodal axilar.....	69
Gráfico 6	Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao estadiamento patológico.....	70
Gráfico 7	Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao infiltrado inflamatório.....	71
Gráfico 8	Expressão de ZAP70 em células epiteliais de câncer de mama luminal em relação à presença de infiltrado inflamatório.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características descritivas das pacientes selecionadas para análise de <i>tissue microarray</i> (TMA).....	55
Tabela 2	Características clínico-patológicas das pacientes selecionadas para análise de <i>microarray</i> e <i>tissue microarray</i> (TMA).....	57
Tabela 3	Número de tumores Luminal A e B de acordo com a presença de infiltrado inflamatório graduado como ausente, leve, moderado e intenso nas amostras do TMA	72
Tabela 4	Frequência e porcentagem de infiltrado inflamatório agrupados nas amostras do TMA.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características de pacientes e tumores para análise de microarray em banco de tumores.....	20
Quadro 2	Anticorpos utilizados para as reações de imuno-histoquímica.....	35
Quadro 3	Genes diferencialmente expressos entre células estromais de tumores de pacientes com câncer de mama.....	43
Quadro 4	Funções enriquecidas em genes diferencialmente expressos entre células estromais de câncer de mama Luminal A e Luminal B	44
Quadro 5	Análise de infiltrado inflamatório em HE (hematoxilina-eosina nas amostras usadas para o <i>microarray</i>	46
Quadro 6	Expressão dos marcadores de células de resposta imune em câncer de mama.....	47

RESUMO

Makdissi FBA. *Influência do microambiente no prognóstico do câncer de mama*. [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: Os cânceres de mama subtipos Luminal A e B (HER2 negativo) podem apresentar prognóstico variável, a depender do índice de proliferação, avaliado pelo Ki67. As células malignas e as células estromais adjacentes (fibroblastos e células de resposta imune) podem interagir tanto pelo contato célula a célula como por fatores secretados por elas, ambas influenciando no comportamento tumoral. Já foi demonstrado que as células estromais podem aumentar a proliferação das células do câncer de mama. **Objetivo:** Nosso objetivo foi avaliar o perfil de expressão gênica de células do estroma em câncer de mama luminal A e luminal B e analisar se este se correlaciona com o prognóstico da doença. **Pacientes e Métodos/ Resultados:** Amostras de tumores de 11 pacientes na pós menopausa foram analisadas, todas elas HER2 negativas. A expressão de Ki67 foi $\leq 10\%$ em 5 pacientes (luminal A) e $\geq 30\%$ em outras 6 amostras (Luminal B). Células estromais foram microdissecadas para a extração de RNA, que posteriormente foi hibridizado na plataforma de microarray Agilent G485 -1A GE 8x60K. Após a normalização, 50 % dos genes com a maior variância foram selecionados para análise por SAM duas classes desemparelhado (software TMEV) e aceitando FDR 14.1%, 35 sequências foram identificadas como diferencialmente expressas, incluindo 16 genes conhecidos, entre as células estromais das amostras de Luminal A versus Luminal B, todos mais expressos nas amostras B. Dentre as funções biológicas enriquecidas em genes diferencialmente expressos encontram-se regulação positiva do sistema imune, incluindo genes como ZAP70 (proteína quinase 70kDa associada a cadeia zeta (TCR)), CD38 (molécula CD38); UBASH3A (ubiquitina associada e SH3 domínio que contém A); PLA2G7 (fosfolipase A2, grupo VII (fator acetil ativador de plaquetas no plasma)); NCR3 (citotoxicidade natural, provocando receptor 3). Nosso próximo passo foi avaliar se a expressão de alguns genes selecionados estava associada com prognóstico de tumores luminais. Para tal selecionamos amostras de outro grupo de 89 pacientes com seguimento de pelo menos 5 anos, cujos tumores eram ER(+), HER2(-), para análise de expressão proteica em *Tissue microarray*. Caracterizamos os fibroblastos destas amostras com 3 marcadores de fibroblastos: actina de músculo liso (AML), S100A4 e caveolina-1 (CAV1) e analisamos a marcação da proteína ZAP70. Correlacionamos a expressão proteica de todos os marcadores com as características anatomopatológicas da amostra. Observamos que fibroblastos de todas as amostras de tumor de mama expressam AML, S100A4 e CAV1, em diferentes proporções, entretanto não detectamos diferença entre os tumores luminais A e B. Também não observamos diferença de expressão de AML, S100A4 e CAV1 em relação a grau histológico, comprometimento linfonodal e estadiamento clínico. Nestas amostras não detectamos expressão proteica de ZAP70 em fibroblastos tumorais. **Conclusão:** Houve expressão diferencial de 16 genes relacionados a processos imunes, todos eles mais expressos em células estromais de tumores Luminal B em relação a luminal A.

Descritores: Neoplasias de mama; Neoplasias de mama/classificação; Receptores estrogênicos; Células estromais; Fibroblastos; Microambiente tumoral; Expressão gênica; Processos do sistema imunológico

ABSTRACT

Makdissi FBA. *Influence of the microenvironment on breast cancer prognosis*. [Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: Luminal breast cancer subtypes A and B (HER2 negative) may present a variable prognosis, depending on tumor proliferation index, evaluated by Ki67 expression. Malignant cells and adjacent stromal cells (fibroblasts and immune response cells) may interact by both cell contact and secreted factors and influence tumor behavior. It was shown that stromal cells may enhance breast cancer cells proliferation. **Objective:** Our aim was to evaluate stromal cells gene expression profile in luminal A and luminal B tumors and to evaluate whether selected transcripts expressed in stromal cells may be associated with prognosis in breast cancer. **Material/ Methods and Results:** Hormone receptor positive tumor samples from 11 post menopausal patients were analyzed, all of them Her2 negative. Ki67 expression $\leq 10\%$ (luminal A) was observed in five and Ki67 $\geq 30\%$ (luminal B) in six samples. Stromal cells were microdissected for RNA extraction, which was hybridized in Agilent G485-1A GE 8x60K microarray platform. After normalization, 50% of the genes with the highest variance were selected for further analysis by two class unpaired SAM (TMEV software) and accepting FDR 14,1%, 35 sequences, including 16 known genes, were found differentially expressed between stromal cells from luminal A vs luminal B breast cancer samples, all of them more expressed in luminal B. Among biological functions enriched in genes found differentially expressed were positive regulation of immune system process, including genes as: ZAP70 (zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa); CD38 (CD38 molecule); UBASH3A (ubiquitin associated and SH3 domain containing A); PLA2G7 (phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma); NCR3 (natural cytotoxicity triggering receptor 3). Our next step was evaluate whether expression of selected genes was associated with prognosis in another group of patients. Tumor samples from 89 patients with at least 5 years of follow up, all of them estrogen receptor positive and HER2 negative, were selected. Tissue microarray was prepared with stromal tumor compartment from paraffin embedded tumor samples. Fibroblasts were characterized for the expression of 3 fibroblasts markers (α -SMA, alpha smooth muscel actin; S100A4 and CAV1, caveolin 1), and ZAP70. Correlation of expression of these markers with prognostic variables was determined. Expression of α -SMA, S100A4 and CAV1 was detected in fibroblasts from all tumor samples in different proportions, however no differential expression was observed between luminal A and B tumors. Neither difference was detected on the expression of these proteins in relation with histological grade, lymph node involvement and clinical stage. **Conclusion:** A differential expression of 16 genes involved in immune process was found, all of them more expressed in fibroblasts from luminal B as compared with luminal A tumors.

Descriptors: Breast neoplasms; Breast neoplasms/classification; Receptors, estrogen; Stromal cells; Fibroblasts; Tumor microenvironment; Gene expression; Immune system, process.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um problema de saúde pública no mundo. Só no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de mama esperados para 2012 foi de 52.680, com um risco estimado de 52,50 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011). Mesmo com todo avanço no diagnóstico e tratamento, 20 a 30% das pacientes com tumores considerados precoces apresentarão uma recorrência ao longo do tempo (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group – EBCTCG 2005).

O tratamento do câncer de mama tem sido cada vez mais personalizado e a escolha do melhor esquema terapêutico se baseia nas características clínicas e patológicas das pacientes e dos tumores. Pode incluir modalidades como: cirurgia da mama e da axila; radioterapia; quimioterapia; hormonioterapia e imunoterapia. Durante muitos anos o tamanho do tumor e o número de linfonodos comprometidos na axila foram considerados os melhores marcadores para guiar o tratamento clínico adjuvante das pacientes. Com o tempo, biomarcadores se tornaram grandes aliados a estas características, sendo que três deles melhor auxiliam na decisão do tratamento a ser escolhido: Receptor de estrógeno, receptor de progesterona e a proteína de membrana (Her2).

Mais de 70% dos tumores de mama respondem a estímulo hormonal, e por isso são chamados receptor de estrógeno positivos - ER(+).

Apresentam algumas características comuns, mas não exclusivas como: freqüentemente são tumores de baixo grau histológico, apresentam elevada diferenciação glandular. Além disso incluem tipos histológicos de bom prognóstico (tubular, mucinoso, lobular, etc) (Putti et al., 2005). Entretanto, nem todos os tumores, apesar dos receptores positivos, respondem adequadamente ao bloqueio hormonal, o que nos mostra a intensa heterogeneidade biológica destes tumores. A presença de receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) tem sido utilizada para determinar a estratégia do uso de bloqueio hormonal (Fisher et al., 1988; Gusterson et al., 1992; Allred et al., 1992; Murphy et al., 2002).

Já o proto-oncogene HER2 codifica uma glicoproteína transmembrana com atividade de tirosina-quinase que está super expressa em 15-20% dos tumores de mama e está associada à maior agressividade, maiores taxas de recorrência e mortalidade principalmente em pacientes linfonodo positivos (Gusterson et al., 1992; Allred et al., 1992). A presença de Her2 superexpresso prediz resposta ao anticorpo trastuzumab (Herceptin) (Goldhirsch et al., 2013) e o uso desta droga reduz o risco de recorrência melhorando a sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevida global (SG) na pacientes HER2 positivas (Bedard e Picart-Gerbhard 2008).

Esta estratificação biológica das pacientes e seus tumores, utilizada na prática clínica, é um ótimo guia para a escolha dos tratamentos adjuvantes, porém com o desenvolvimento do estudo molecular, as chamadas assinaturas genéticas têm se mostrado de grande importância

para oferecer melhores informações e perspectivas (Fisher et al., 1983; Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Parker et al., 2009).

Em 2000 Perou et al. classificaram o câncer de mama em subtipos de acordo com a expressão gênica dos tumores. Através do estudo da tecnologia de microarray, a expressão de um elevado número de genes pôde ser mensurado e inicialmente 4 subtipos moleculares foram identificados, sendo os subtipos Luminais os mais frequentes (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Baseado nestes estudos e em estudos subseqüentes, hoje são descritos pelo menos 5 subtipos tumorais (Sorlie et al., 2001; Prat e Perou 2011; Kao et al., 2011), agrupados de acordo com suas características clínicas e assinatura genética (genes diferencialmente expressos) e que apresentam evolução clínica e implicações diferenciadas em seu tratamento.

O subtipo tumoral chamado Luminal A apresenta, em relação a outros subtipos, maior expressão de vários genes da via de ligação hormonal, como ER α e genes co-regulados pelo ER como GATA 3, (proteína zinc finger trefoil fator 3), ou ainda regulados por ER como PR (receptor de progesterona), e BCL-2, um gene antiapoptótico. Expressam citoqueratinas luminais como CK 18/19 e têm expressão negativa de c-erbB-2 (Habashy et al., 2011). Outros marcadores de tumores luminais A foram sugeridos, tais como a proteína chamada Forkhead-box protein 1 (FOXA1). Esta proteína parece ser marcador de bom prognóstico e sua expressão apresenta associação positiva com a de RERG (Ras-like, estrogen-regulated, growth-

inibitor), outro marcador de bom prognóstico em tumores ER(+) (Badve et al., 2007; Ademuyiwa et al., 2010).

Apesar da análise de expressão gênica global por microarray haver contribuído para uma melhor definição dos tipos de tumor de mama também apontou para a heterogeneidade dos tumores luminais e a diferenciação dos subtipos intrínsecos é ainda motivo de muita discussão. Nos primeiros trabalhos apresentados a subclassificação dos tumores ER(+) propunha três grupos: Luminal A, Luminal B e Luminal C (Sorlie et al., 2001). Enquanto se observou uma alta taxa de concordância entre observadores ao se classificar os subtipos luminal, basal e HER2, o mesmo não aconteceu ao se subdividir tumores luminais em A, B e C (Mackay et al., 2011). Isto pode ser devido ao fato de haver uma superposição de genes entre os grupos B e C. A maioria dos estudos sugeria a subdivisão em somente dois grupos: Luminal A e Luminal B. O subtipo luminal B clássico caracterizava tumores que apresentavam receptor de estrógeno positivo - ER (+), mas que concomitante a isso apresentavam amplificação do HER2, baixa expressão dos genes acima descritos no luminal A e altos níveis de genes ligados à proliferação (Sorlie et al., 2003). Esta divisão também foi baseada nas diferenças estatísticas de sobrevida entre os dois grupos (Hu et al., 2006).

Quando foram realizados ensaios de imunoistoquímica (IIQ) observou-se que as amostras provenientes de pacientes que apresentavam bom prognóstico com sobrevida livre de doença (SLD) em 10 anos de 78% (Cheang et al., 2009) correspondiam a tumores expressando receptores de estrógeno e/ou progesterona, e apresentando baixa taxa de proliferação

celular ($Ki67 \leq 13.25\%$, os quais foram designados especificamente como Luminais A (Hugh et al., 2009). Habashy et al. em 2011 sugeriu chamá-los de luminais “puros”. A partir desta definição, o chamado Luminal B passou a envolver uma outra subdivisão: Luminal B e Luminal B/HER2. A análise posterior das curvas de sobrevida deste subgrupo indicou que os pacientes com tumores ER(+) e HER2 negativos apresentavam-se com prognóstico diferente das pacientes Luminal A ou Luminal B/HER2 positivos. Neste grupo de tumores foram identificados receptores de estrógeno e/ou progesterona, uma alta taxa de proliferação celular ($Ki67 \geq 13.25\%$ e HER2 negativo) (Cheang et al., 2009). Vários trabalhos indicam que este subtipo de tumor apresenta ativação das vias de proliferação. Dentre os genes mais expressos em tumores luminais B encontram-se vários relacionados à proliferação como v-MYB (myeloblastosis viral oncogene homolog (avian-like 2)), GGH (gamma-glutamyl hydrolase), LAPTM4, NSEP1 (Y box binding protein 1) e CCNE1 (ciclina E1; genes associados) a EGFR (receptor de fator de crescimento epidermal) como H-RAS e MEK2 (Hoadley et al., 2007). Outros genes mais expressos neste subgrupo são: o CXXC5, relacionado a mecanismos de via Wnt e migração de células tronco (Parker et al., 2009) e o NHERF1 (também chamado SLC9A3R1-solute carrier family 9 - sodium/hydrogen exchanger- member 3 regulator) (Karn et al., 2011). A sobrevida deste grupo é reduzida quando comparada aos pacientes Luminais A (Cheang et al., 2009), mas o que define esta diferença ainda é motivo de estudo. Discute-se o perfil gênico deste subgrupo, com alguns

autores referindo que a heterogeneidade clínica se deve à heterogeneidade genética, com influência epigenética preponderante.

Em 2004, Paik et al. publicaram um preditor de risco de recorrência para pacientes tratadas de câncer de mama hormônio sensíveis-RE (+) que não apresentavam comprometimento axilar e que foram submetidas ao tratamento hormonal com tamoxifeno. Neste trabalho 668 tumores foram avaliados para 21 genes (16 genes câncer relacionados e 5 genes de referência) e três subgrupos de pacientes foram definidos de acordo com o risco de recorrência em 10 anos. Um primeiro grupo de baixo risco (6,8% de risco de recorrência em 10 anos), um grupo de risco intermediário (14,3%) e outro grupo de alto risco para recorrência (30%), sendo que este se assemelha ao risco de recorrência que acontece em pacientes com linfonodos comprometidos. De todo o painel dos 16 genes (relacionados a câncer), os genes relacionados à proliferação são os que se destacam e acredita-se serem os responsáveis por elevar o risco de recorrência. São eles: Ki67, STK15 (aurora kinase A), Survivina, CCNB1 (ciclina B1) e o MYBL2 (myeloblastosis viral oncogene homolog (avian-like 2)). Observou-se desta forma, que as vias de proliferação parecem estar mais freqüentemente associadas ao risco de recorrência do tumor, e tais vias são preferencialmente expressas nos tumores Luminais B.

No entanto, em 2009 Loi et al. baseando-se em um grupo de genes descritos como mais expressos nos tumores Luminais B realizaram um estudo in vitro e demonstraram que há similaridade entre a célula cancerosa Luminal B e a célula MCF7 (padrão Luminal A) quando exposta a fatores de

crescimento. Este estudo demonstrou que a célula epitelial exposta a meio propício, rico em fatores de crescimento modifica a resposta celular, ou seja, o meio pode modificar a resposta celular e há evidências de que o microambiente pode promover proliferação, transformação e migração celular. Modificações epigenéticas podem ocorrer em lesões precursoras quando o estroma é ativado (Tlsty 2001).

O microambiente tumoral é formado pelas células epiteliais tumorais, e por estroma especializado, rico em células inflamatórias e fibroblastos ativados, ambos sintetizando componentes de matriz extracelular (MEC) e fatores de crescimento (Tlsty 2001; Bergamaschi et al., 2008). A MEC é definida por um conjunto de proteínas (proteoglicanas e glicoproteínas de adesão) como colágeno e laminina que promovem estrutura e suporte mecânico para as células e tecidos. Os fibroblastos associados ao tumor (CAFs) constituem-se no tipo celular mais comum no estroma e produzem as proteínas da matriz extracelular, bem como um conjunto de quimiocinas e fatores de crescimento, os quais são importantes na regulação de expressão gênica, divisão celular, sobrevivência, remodelamento e movimento, contribuindo para a disseminação e metástase (Allen et al., 2011). Assim como os fibroblastos, os linfócitos infiltrados no tumor parecem influenciar no prognóstico das pacientes (Liu 2007; Martinet et al., 2011). Em câncer de mama o significado exato desta inflamação é ainda controverso.

Vários estudos utilizando o modelo de co-cultura de células sugerem que fibroblastos originários de tecido normal tendem a inibir, ao contrário de fibroblastos obtidos de tumores, os quais tendem a induzir, a proliferação

tumoral confirmando a evidência que tanto o contato direto entre células, como fatores secretados por elas, possam interferir diferencialmente na proliferação e invasão tumoral (Lefebvre et al., 1995; Dong-Le et al., 1997; Kunz-Schughart et al., 2001; Shekhar et al., 2001; Sadlonova et al., 2005; Wang et al., 2002). Como o meio é capaz de modificar o fenótipo das células, trabalhos demonstram que diferentes meios de cultura induzem células epiteliais mamárias a se desenvolverem de forma variada com maior ou menor capacidade tumorigênica. Além disso, fibroblastos ativados por transfecção (chamados transformados) com fator de crescimento TGF- β e/ou HGF podem estimular a carcinogênese mamária (Kuperwasser et al., 2004). Demonstrou-se também, que a injeção de fibroblastos juntamente com células de câncer de mama em animais pode induzir o desenvolvimento tumoral, especialmente se os fibroblastos foram obtidos de amostra de câncer da mama (Krtolica et al., 2001; Orimo et al., 2005).

Estudos mais recentes de co-cultura de diferentes células mamárias normais ou tumorais com células tumorais, principalmente fibroblastos, demonstraram mudanças na expressão gênica recíproca em ambos os tipos celulares (Casbas-Hernandez et al., 2011). Em estudo do nosso grupo, comparamos as interações que ocorrem no tumor primário e no tecido mamário normal, utilizando um modelo de co-cultura com separação por membrana porosa, que permite a passagem de fatores solúveis. Fibroblastos obtidos do sítio primário de pacientes com câncer de mama ou fibroblastos oriundos de tecido mamário normal de pacientes sem câncer (fibroadenoma) foram co-cultivados com linhagem de câncer de mama MDA-

MB231 ou linhagem mamária normal MCF10A). Observamos que existe uma interação entre estes tipos celulares e que fibroblastos e células epiteliais exercem uma regulação recíproca na expressão gênica. Fibroblastos oriundos do câncer de mama, bem como de mama normal, influenciam a expressão gênica de células MDA-MB231 e cerca de 50% destes genes sofrem regulação semelhante, isto é, são modulados por fatores secretados por fibroblastos de ambas as origens (tecido mamário normal ou tumoral). Dentre os genes modulados em células MDA-MB231 exclusivamente por fibroblastos de origem tumoral, encontramos genes envolvidos em transporte celular, vias de sinalização MAPK, WNT e receptores Toll-like (Rozenchan et al., 2009). Em outra abordagem, analisamos a influência de fibroblastos na expressão gênica de linhagens de células epiteliais de câncer de mama comparando fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos e não comprometidos de pacientes com câncer de mama, usando o modelo de co-cultura. Este estudo mostrou que fibroblastos originados de linfonodos também influenciam positivamente a proliferação e invasão de linhagens de carcinoma de mama com as quais foram co-cultivados (Santos et al., 2011). De forma conjunta, epitélio e estroma, lado a lado criam um microambiente em que interações e estímulos recíprocos influenciam o desenvolvimento tumoral. A absoluta maioria dos trabalhos leva em conta o tumor em sua totalidade e não separa as células para diferenciar epitélio de estroma. Bergamaschi et al. em 2008 buscaram separar as respostas epiteliais das respostas estromais dos tumores e demonstraram que, assim como há uma subdivisão nos tumores de mama baseado na análise de tumor total e

portanto nas células epiteliais, os tumores também podem ser subdivididos de acordo com sua resposta estromal. Segundo os autores, 4 subtipos tumorais podem ser identificados de acordo com sua matriz extra-celular (MEC1, MEC2, MEC3, MEC4). Quando os subtipos descritos por Perou et al. (2000) foram comparados aos novos subtipos estromais sugeridos por Bergamaschi et al. (2008) os tumores basal like, em sua maioria, pertenciam à classe MEC1, assim como alguns luminal B e HER2. Já os tumores Luminal A foram encontrados em todas as classes de MEC, embora com menor frequência em MEC1. Isso mostrou que a classificação MEC foi parcialmente independente do sub tipo intrínseco e poderia ser usado como uma subdivisão dos tumores. Genes envolvidos na infiltração linfóide (como as interinas ITGAM, ITGB2/7/8 e ITAG6/9), na adesão celular e interação com células hematopoiéticas (PECAM1), SELL e metalopeptidases apresentam expressão significativamente elevada nos tumores MEC1, enquanto que os tumores MEC4 apresentaram aumento na expressão de serpinas (inibidores de proteases). Portanto, estes estudos demonstraram que o microambiente pode ser um fator isolado e importante na resposta do tumor e em sua evolução.

Posteriormente, em 2011, Camp et al. demonstraram que a interação entre fibroblastos e células tumorais basais ou luminais em cultura resulta em diferentes comportamentos biológicos e assinaturas gênicas que distinguem com precisão de 98% estes tumores. Vários estudos apontaram para a influência dos fibroblastos no prognóstico (Finak et al., 2008; Ma et al., 2008; Bianchini et al., 2010; Planche et al., 2011; Triulzi et al., 2013).

Alguns destes estudos incluíram perfis gênicos obtidos em estroma microdissecado (Finak et al., 2008; Ma et al., 2008; Planche et al., 2011) e identificaram marcadores estromais relevantes para a progressão e metástase tumoral, usando diferentes estratégias. Finak et al. (2008) e Planche et al. (2011) compararam estroma tumoral e normal adjacente para definir uma assinatura reativa, que se mostrou relacionada ao prognóstico. Sendo assim, a assinatura do estroma parece estar relacionada ao prognóstico das pacientes. Ma et al. (2008) compararam a assinatura estromal de tecido normal adjacente, CDIS e carcinoma invasivo e mostraram que esta se correlaciona com a progressão tumoral.

Os fibroblastos representam os constituintes mais freqüentes do estroma. São células não epiteliais, não vasculares e que apresentam morfologia alongada e fusiforme (Kalluri e Zeiberg 2006). Não existe um marcador exclusivo de fibroblasto, assim como eles não expressam os mesmos marcadores quando retirados de órgãos diferentes. A vimentina é um de seus marcadores e está positiva em fibroblastos de várias origens, no entanto a depender do sítio primário o fibroblasto expressa diferentes marcadores, com intensidades variadas, como se fossem células diferentes entre si. Além disso, vários marcadores têm sido utilizados para caracterizar fibroblastos em sua forma ativada, entre eles, actina de músculo liso (AML), S110A4, e caveolina 1 (CAV1) (Micke e Ostman 2004, Grum-Schwensen et al., 2005, Witkiewicz et al., 2009). Entretanto, não existe até o momento uma caracterização ampla dos fibroblastos de tumores luminais.

Em resumo, o microambiente do tumor parece envolvido em indução de proliferação e migração das células tumorais, bem como no prognóstico do câncer de mama.

Por estes motivos, as questões atuais são:

- 1 Avaliar se esta assinatura estromal, especificamente em tumores ER(+) hormônio dependentes Luminais A, pode estar associada ao prognóstico diferencial do subtipo Luminal B sem expressão de HER-2, algo que até o momento não foi estabelecido. Como exposto anteriormente, uma das características diferenciais mais importantes entre estes subtipos é a resposta proliferativa;
- 2 Analisar se a expressão em estroma de câncer Luminal A e expressão em estroma de câncer Luminal B são diferentes;
- 3 Estudar como se comportam os marcadores de fibroblastos descritos na literatura nos tumores Luminais A e B.

Nosso objetivo foi analisar diferenças na assinatura transcricional do microambiente obtido de pacientes com tumores subtipo tumores Luminal A e Luminal B, HER-2 negativos e como estas mudanças no microambiente poderiam influenciar o comportamento do tumor, assim como fenotipar os marcadores de fibroblastos nestes dois grupos. Para isto, tumores primários de pacientes com câncer de mama ER(+) foram separados clinicamente pela expressão de KI67 em dois subtipos específicos: Luminal A e Luminal B sem expressão de HER-2. Através da análise da expressão gênica diferencial dos componentes do microambiente destes dois grupos de amostras, determinamos se estes diferentes perfis estromais estavam

associados ao prognóstico dos tumores luminais A e B, avaliados pelas características clínico patológicas e evolução em 5 anos em um número maior de pacientes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o perfil transcricional de células do estroma do microambiente do câncer de mama dos subtipos luminal A e luminal B e avaliar sua relação com prognóstico da doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Comparar a expressão gênica de células estromais em câncer de mama luminal A (baixo índice proliferação)e luminal B (alto índice de proliferação) no sítio primário,
- 2 Caracterizar os fibroblastos através da expressão de diferentes marcadores em tumores Luminal A e Luminal B,
- 3 Correlacionar todos os marcadores com as características clínico patológicas associadas ao prognóstico da doença.

PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA PARA O *MICROARRAY*

Nesta fase do estudo foram incluídas 11 amostras de pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo da mama confirmado por exame histopatológico fornecidas pelo Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. As pacientes foram atendidas pelo Grupo de Mastologia do A.C.Camargo Cancer Center nos anos de 2009 e 2010. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) (Anexo 5). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de inclusão:

- Amostras de pacientes na pós-menopausa;
- Diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo da mama;
- Com ou sem comprometimento linfonodal confirmado por anátomo-patológico;
- Tumor positivo para expressão de receptor de estrógeno;
- Tumor negativo para HER2 (0, 1 ou 2 +) e teste de Fish negativo nos casos HER2: 2 (+);
- Pacientes submetidas a tratamento cirúrgico inicial.

Critérios de exclusão:

- Amostras de pacientes com tumor HER2 positivos HER2 (3+) ou Fish (+);
- Amostras de pacientes com valores de Ki67 que estivessem próximos aos valores de corte (entre 10 a 20%);
- Carcinoma lobular invasivo;
- Amostras de pacientes com diagnóstico prévio de câncer invasivo da mama tratadas previamente com quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia;
- Amostras de pacientes com carcinoma metastático.

Critérios para considerar tumor Luminal A:

- Carcinoma ductal invasivo, e expressão imunoistoquímica positiva para receptor de estrógeno e ou progesterona > 10%, HER2 negativo e Ki 67 $\leq$ 10% (Ki 67 cut point 13,25 %); (Cheang et al., 2009).

Critérios para considerar tumor Luminal B:

- Carcinoma ductal invasivo, e expressão imunoistoquímica de receptor de estrógeno e ou progesterona positivos (>10%, HER2 negativo),
- Ki 67 $\geq$ 20% (Ki 67 cut point 13,25 %); (Cheang et al., 2009).

Segue no Quadro 1 as características das pacientes selecionadas para a coleta de material microdissecado para a realização do microarray.

Quadro 1 - Características de pacientes e tumores para análise de microarray em banco de tumores.

ID	id	T	N(+)	N(t)	GN	GH	ER	PR	HER2	Ki67	SubTipo
1	60	2,7	2	21	2	1	80	70	1	10	LumA
2	55	3	2	17	2	2	90	90	1	10	LumA
3	55	5	1	22	1	1	95	90	1	10	LumA
4	55	1,7	0	1	2	2	70	50	1	1	LumA
5	62	2,5	0	2	2	2	95	30	1	10	LumA
6	67	3	3	13	3	2	90	80	1	30	LumB
7	67	3	6	20	2	2	40	10	0	40	LumB
8	54	2	14	16	3	3	100	90	1	50	LumB
9	72	2,5	2	9	3	3	90	90	2	30	LumB
10	60	3,3	1	11	2	2	90	1	1	30	LumB
11	56	4	4	19	3	3	100	5	1	50	LumB

Legenda: ID número do caso; id – idade da paciente; T- tamanho do tumor em cm; N(+)- número de linfonodos comprometidos após esvaziamento axilar; N(t)- número de linfonodos retirados no esvaziamento axilar; GN- grau nuclear (1,2,3); GH- grau de SBR (I- 1,II- 2,III- 3); ER- status do receptor de estrógeno (porcentagem de positividade à imunoistoquímica); PR- status do receptor de progesterona (porcentagem de positividade à imunoistoquímica); status do receptor de c-erb B2 (escores 0,1,2 sendo que quando escore 2 o teste de FISH foi negativo); Ki67- porcentagem de positividade; SubTipo: subtipos Luminal A (LumA) ou Luminal B (LumB)

3.2 CASUÍSTICA PARA O TMA

Nesta fase do estudo foram inicialmente incluídas 111 amostras de pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo da mama confirmado por exame histopatológico e que tivessem seguimento de 5 anos. Logo, estas amostras são de pacientes que foram atendidas e/ou operadas pelo Grupo de Mastologia do A.C.Camargo Cancer Center entre os anos de 2004 a 2008. Estas amostras foram fornecidas pelo arquivo de blocos de tumores do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center. Após

detalhamento da evolução clínica destas pacientes foram excluídas 22 pacientes (de acordo com critérios abaixo) e o número final para análise dos resultados foi de 89 pacientes. Também nesta fase do trabalho todas as pacientes tinham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido consentindo que as amostras fossem utilizadas para estudos.

Critérios de inclusão para o TMA:

- Amostras de pacientes de qualquer idade, cujo bloco de parafina estivesse nos arquivos do Departamento de Mastologia do A.C.Camargo Cancer Center;
- Diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo da mama
- Com ou sem comprometimento linfonodal confirmado por anatomopatológico;
- Tumor positivo para expressão de receptor de estrógeno na biópsia ou na peça cirúrgica;
- Tumor negativo para HER2 (0, 1 ou 2 +) e teste de Fish negativo nos casos HER2: 2 (+);
- Pacientes submetidas a tratamento cirúrgico inicial.

Critérios de exclusão para a análise do TMA:

- Amostras de pacientes com tumor HER2 positivo (HER2 3+) ou Fish (+) quando testados posteriormente;
- Carcinoma lobular invasivo;

- Amostras de pacientes com diagnóstico prévio de câncer invasivo da mama tratadas previamente com quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia;
- Amostras de pacientes com carcinoma metastático sincrônicos.

3.3 MICRODISSECÇÃO A LASER (LCM)

A microdissecção a laser (LCM) é uma metodologia capaz de aumentar sensivelmente a acurácia e a sensibilidade dos estudos moleculares, pois possibilita a extração de uma população celular homogênea de um tecido morfológicamente complexo, garantindo que apenas as células de interesse sejam isoladas. passada realizada pelo Setor de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

Os fragmentos de tumor são retirados do freezer do Banco de Macromoléculas e lâminas de 10 µm são cortadas e confeccionadas para o preparo da microdissecção. Uma lâmina é corada com hematoxilina e eosina para confirmação do material a ser microdissecado e as demais são preparadas.

- 1 O aparelho utilizado será o *Pincel Laser Capture Microdissection System* (Arcturus Systems for Microgenomics pertence ao Departamento de Anatomia Patológica do I A.C.Camargo Cancer Center (Figura 1). Este sistema consiste basicamente de um microscópio invertido ao qual é acoplada uma fonte de raio laser infravermelho de baixa potência e uma câmera ligada a um monitor e

um computador. A lâmina com o corte histológico é fixada ao chariot por um mecanismo de sucção a vácuo.

O feixe de raio laser incide sobre um cap revestido por um filme termoplástico. O cap fica posicionado entre o feixe de laser e o corte histológico. Com o disparo do feixe de laser o filme termoplástico expande e adere à célula escolhida. Quando o pulso cessa, o filme retrai levando consigo esta célula. Desta forma, repete-se a operação tantas vezes quantas forem necessárias, sendo que a quantidade de células varia de acordo com o tipo de tecido e com o estudo que será realizado. Na maior parte das vezes utilizamos 1500 tiros em um tempo de 10 minutos de disparos (Figura 1).

Ao final da operação retira-se o cap com as células e se segue a extração do RNA total utilizando *PicoPure RNA Isolation Kit* (Arcturus) seguindo as recomendações do fabricante.

Figura 1 - Foto Ilustrativa do Aparelho de Microdissecção: ArcturusXT™
Microdissection System

Figura 2 - Áreas de tecido estromal de câncer de mama selecionadas para microdissecção. Fotografias obtidas da tela do sistema de microdissecção ArcturusXT™ de uma mesma amostra.

3.4 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE RNA DE MATERIAL PROVENIENTE DE MICRODISSECÇÃO A LASER

Para extração de RNA os caps foram acoplados em microtubos e as células lisa das adicionando-se 10µL de tampão de extração, após incubação a 42°C por 30 minutos e centrifugação de 2 minutos a 800 x g, o extrato celular foi diluído com 10µL de etanol 70% (volume final: 20µLe) adicionado a coluna condicionada com tampão para RNA. Após duas centrifugações sucessivas (a primeira a 100 x g por 2 minutos, seguida por 16000 x g por 30 segundos) foi realizada duas lavagens com tampões de diferente composição: W1 (8000 x g por 1 minuto) e W2 (16000 x g por 2 minutos). O RNA total foi eluído e quantificado em espectrômetro NanoDrop. Todos os tampões e colunas utilizadas na etapa para extração de RNA, pós microdissecção são do kit Arcturus PicoPure RNA isolation.

No mínimo 100 pg de RNA total extraído dos tecidos (célula estromal) - fibroblastos obtidos por microdissecção a laser foi amplificado utilizando-se o kit Reboam HSPlus2-round (Life Technologies) da forma que se segue descrita.

Ao RNA total das amostras foram adicionados 2µL de Spike B, enquanto ao RNA referência (Universal Reference RNA from stratagene) (740000) foi adicionado 2µL de Spike A diluídos apropriadamente (1ª diluição: 1/20; 2ª diluição: 1/40; 3ª diluição: 1/4; 4ª diluição: 1/10 (1ª diluição; 5ª diluição: 1/10). Os Spikes A e B (Agilent apresentam composição distinta de transcritos poliadenilados sintéticos que apresentam razões pré-

determinadas utilizados no ensaio de microarray como parâmetros de qualidade: linearidade, sensibilidade e acuracidade. O RNA referência é uma mistura de RNAs totais de 10 linhagens, o qual é utilizado largamente em microarray para hibridização competitiva.

Ao RNA total acrescido do Spike apropriado foi adicionado 1 µL de Primer1 e após a incubação por 5 minutos a 65°C, 9µL de uma mistura para síntese da primeira fita (tampão, enzimas, enhancer para reação de 1ª fita de cDNA e SuperScript TM III) foram adicionadas e ao término da incubação de 42°C por 1 hora o RNA residual foi eliminado do cDNA obtido pela adição de Rance (37°C por 30 minutos seguidos de 99°C por 5 minutos). A segunda fita de cDNA foi sintetizada a partir do cDNA primeira fita obtido no passo anterior pela adição de 1µL de primers 2 e após incubação por 2 minutos a 95°C. Nesta reação foi adicionado 30µL de mistura para segunda fita contendo tampão e enzimas que foi incubada: 25°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos, 70°C por 5 minutos. A purificação do cDNA foi realizada utilizando coluna tratada com tampão de ligação para DNA e posteriormente iludo com tampão apropriado.

Para a transcrição in vitro foi adicionando a 10µL de cDNA purificado, 12µL de uma mistura com tampão, nucleotídeos, enzimas e enhancer para reação de transcrição in vitro. Após a incubação a 42°C por 6 horas o RNA complementar (RNA) da primeira etapa foi adicionado DNAs a 37°C por 15 minutos e os RNA livre de DNA foi purificado utilizando coluna tratada com tampão de ligação para RNA e iludo com tampão apropriado. A segunda etapa de amplificação será iniciada pela síntese de cDNA 1ª fita a partir do

RNA obtido. Para a síntese da 1ª fita de cDNA foi adicionado Primer2 e a mistura de tampão com composição descrita na 1ª etapa no entanto a reação ocorreu a 25°C por 10 minutos, 37°C por 1 hora, 4°C por 1 minutos. Para a síntese da 2ª fita de cDNA foi adicionado primers 3 e a reação, que ocorreu a 37°C por 30 minuto, 70°C por 5 minutos. O tampão utilizado nesta reação e a purificação foram descritos na 1ª etapa para a síntese de segunda fita de cDNA. A transcrição in vitro será realizada com kit Los Input Quick Hans Labeling Kit, two-color (Agilent) a partir do cDNA obtido da segunda rodada de amplificação. Em 15µL de cDNA será acrescentado 9µL de uma mistura com tampão, enzimas e nucleotídeos marcados com cianina 5 (CY5) (amostras) ou cianina 3 (CY3) (Referência). Após incubação de 40°C por 2 horas o RNAc marcado foi purificado em coluna e eluido com água livre de RNase. O rendimento, pureza e atividade específica do RNAc amplificado foi realizada avaliando as absorbâncias 260 e 280nm para cada cianina utilizando um NanoDrop espectrofotômetro. Amostras que apresentaram rendimento maior que 0.825 ng (formula abaixo), relação 260/280 entre 1,9 a 2,0 e atividade específica maior que 6,0 (ver formula abaixo) foram utilizadas para a hibridização.

Rendimento= (concentração de RNAc (ng/µL* volume de eluição/1000)

Atividade específica=(concentração de cianina/concentração de RNAc (ng/µL*1000).

Assim, o RNAc de 300ng da amostra marcada com cianina 5 e 300ng da amplificação da Referência marcada com cianina 3 foram fragmentados pela adição de tampão apropriado em um volume total de 25µL seguindo

será incubação a 60°C por 10 minutos em banho seco e 2 minutos em banho de gelo. Imediatamente após o término deste tempo foi adicionado 25µL de Ge Hybridization Buffer HI-RPM e sucedeu-se a hibridização competitiva na lamina G4851A SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (Agilent Technologies, USA). Após 18 hs à 65°C no forno de hibridização (Agilent Technologies), USA as lâminas foram lavadas por 2 vezes em tampão de lavagem. As lâminas foram escaneadas no Agilent's High-Resolution C Microarray scanner. Imagens e dados foram obtidos utilizando software específico análise detalhada incluindo filtro de spot outlier, background subtração de características e normalização escorante (linear e LOWESS) foi realizada. Os detalhes das características da lâmina estão no Anexo 1.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO MICROARRAY

Os valores de expressão de cada transcrito gerados após a normalização foram analisados utilizando-se o software Multi Experiment Viewer (MeVSITE).

O primeiro passo foi a utilização de um filtro por variância, a fim de eliminar os transcritos cuja expressão não foi observada em nenhuma das amostras ou transcritos cuja expressão atingiu a saturação, sendo então selecionados os transcritos de maior variância entre amostras. Após a filtragem de 50% ficaram retidos 21.272 sequências, dentre as 42.545 sequências existentes na lâmina.

O algoritmo utilizado para a análise disponibilizado pelo MeV foi o *Significance Analysis of Microarrays* (SAM). SAM é um teste-t modificado que identifica genes estatisticamente significativos, medindo a força da relação entre a expressão do gene e uma variável de resposta. Este método usa estatística não paramétrica, desde que os dados podem não seguir a distribuição normal, onde permutações repetidas dos dados são utilizadas para determinar se a expressão de cada gene está significativamente relacionada à resposta (ao desfecho). Uma das características do SAM é a habilidade de utilizar o valor do FDR (False Discovery Rate), ou seja, o percentual de genes selecionados pelo método ao acaso. O usuário pode ajustar o parâmetro chamado delta para ajustar o FDR. Para cada transcrito o SAM utiliza permutação de dados para identificar o FDR e determina valores de p ajustados. Desta forma controla-se o número de falsas descobertas em cada teste realizado, resultando em uma descoberta realmente significativa. Devido a isso, possui uma maior capacidade para obter resultados verdadeiramente significativos equilibrando a taxa de erro. Foi realizada comparação entre dois grupos de amostras (células estromais de tumores luminal A) versus (luminal B) em análise não pareada com 1000 permutações.

3.6 TÉCNICA DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Utilizamos a técnica de *Tissue Microarray* (TMA) que permite a análise em larga escala da expressão protéica dos tumores através da

imunoistoquímica (Kononen et al., 1998; Andrade et al., 2007). Com esta técnica fica possível conhecer a expressão de uma determinada proteína em centenas de casos diferentes em apenas uma lâmina histológica.

Para isto, um equipamento de precisão automático ou manual insere amostras teciduais de vários blocos doadores em um bloco receptor (Figura 3).

Figura 3 - Equipamento manual para construção dos *Tissue Microarrays*. (Vista frontal com detalhe das agulhas. O bloco doador é posicionado acima da placa acrílica. Após a extração do cilindro tecidual a retirada da placa acrílica expõe o bloco receptor)

O TMA tem a vantagem de custo e tempo para os estudos retrospectivos de grandes centros ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (Hoos e Cordon-Cardo 2001; Sauter e Mirlacher 2002).

A escolha deste método para nossa validação foi exatamente pela facilidade de se estudar ao nível protéico a expressão dos genes selecionados pelo microarray.

O TMA não é um método livre de dificuldades, mas seu uso tem sido defendido em relação aos cortes convencionais pelas seguintes razões (Andrade et al., 2007):

1. Representatividade eficiente através da utilização de diversos blocos e com lâminas de diferentes níveis de corte;
2. Possibilidade de repetição dos experimentos;
3. Estudo de grande número de amostras;
4. Grande economia de tempo e dinheiro;
5. Homogeneidade nos protocolos laboratoriais pela realização de todas as reações simultaneamente.

3.7 CONSTRUÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY*

Para a validação dos resultados foram confeccionadas lâminas de *Tissue microarray* (TMA) compostas sempre por duas áreas representativas da neoplasia para direcionar a obtenção dos cilindros (Figura 4). Uma área escolhida onde havia enriquecimento de epitélio pela verificação da lâmina

corada por hematoxilina e eosina (HE) e outra área enriquecida de estroma para a leitura dos fibroblastos.

Figura 4 - Construção do TMA. A: áreas representativas da neoplasia: uma região rica em epitélio e outra rica em estroma. B: Vista superior do bloco receptor com cilindros de 1.0mm de amostra distantes 0.2mm entre si. C: Imagem da lâmina corada em HE. D: visão panorâmica da lâmina de TMA em coloração HE (aumento de 40X).

A planilha com a ordenação dos casos contidos no bloco receptor está no Anexo 2. Com o equipamento de precisão foram retirados dois cilindros com 1,0 mm de diâmetro do bloco doador para a construção de um bloco receptor com amostras dispostas em duplicata no mesmo bloco.

Do bloco construído foram obtidas 100 lâminas. Utilizamos 5 lâminas para as reações imunoistoquímicas e as lâminas excedentes permanecem conservadas a - 20°C para preservação da reatividade antigênica.

A leitura foi realizada de forma ordenada para o epitélio e para o estroma em momentos distintos, sendo a amostra em duplicata utilizada nos casos de perda do primeiro spot.

3.8 PROTOCOLO AUTOMATIZADO DA IMUNOISTOQUÍMICA: VENTANA

As lâminas foram identificadas com etiquetas de códigos de barras e processadas no equipamento Benchmark XT (Ventana para desparafinização em solução de EZ PREP) e recuperação antigênica por calor em solução CC1 pH alto a 96°C em um tempo previamente padronizado para cada anticorpo.

A peroxidase endógena foi bloqueada por 5 minutos utilizando-se o reagente de bloqueio de peroxidase (ultraView Universal DAB Inhibitor - 3% H₂O₂), seguido de lavagem em solução de lavagem (Wash-buffer).

Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário específico, em reação previamente padronizada (Quadro 2 – Anticorpos).

Quadro 2 - Anticorpos utilizados para as reações de imuno-histoquímica.
Anticorpos (nome do anticorpo, Fabricante e Clone)

Anticorpo	Fabricante	Clone
Ki67	Ventana	30.9
alfa Actina de Músculo Liso (AML)	Cell Marque	1A4
S100A4	Neomarkers	Policlonal
Caveolina 1	Epitomics	E249
ZAP70	Cell Marque	2F3.2
CD20	Ventana	L26
CD3	Ventana	2GV6
CD68	Ventana	KP1

Na seqüência os cortes foram incubados com polímero HRP (HRP Multimercom) subsequentes lavagens em tampão.

Logo após foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidine (DAB) lavados em tampão e contra corados com hematoxilina (Hematoxylin II- Ventana), lavadas em solução de lavagem, água com detergente para retirada do LCS, seguida de lavagem em água corrente destilada.

As lâminas foram desidratadas em álcool, xilol e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film).

3.9 UTILIZAÇÃO E LEITURA DA IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica de imunoistoquímica foi utilizada em 3 fases do trabalho:

Fase 1: Validação técnica através de IIQ para identificação de células de reposta imune nas amostras utilizadas no microarray,

Fase 2: Caracterização de células estromais através do estudo de marcadores de fibroblastos por *Tissue microarray*,

Fase 3: Validação biológica dos genes diferencialmente expressos na análise de expressão gênica em *Tissue microarray*.

A leitura das lâminas de IIQ utilizadas na fase de validação técnica do microarray foram avaliadas de acordo com uma escala, onde foi realizada uma avaliação peritumoral (P) e uma avaliação intratumoral (I) com escala de 1 a 3. Também foi realizada uma relação: célula tumoral x macrófago e uma contagem absoluta em um campo de grande aumento (400x) representativo do caso para ter um valor numérico de quantos macrófagos havia no tumor.

A leitura da IIQ do TMA considerou positividade de marcação, as reações com imunomarcação na célula e na localização subcelular de interesse, que foram quantificadas quanto à intensidade (leve, moderada e forte) e percentagem de células marcadas (0 a 100%). Cada caso recebeu um escore, ou histoscore (HS) baseado na multiplicação da percentagem de células marcadas pela intensidade (1, 2 ou 3 para leve, moderado e forte, respectivamente). O HS, portanto, pode variar entre 0 e 300 (Andrade et al., 2007).

A leitura das lâminas de cada anticorpo foi realizada num só dia para diminuir a variabilidade de interpretação intraobservador.

Considerou-se apenas o resultado dos discos presentes (ou adequados para a análise. Quando não havia amostragem celular adequada em nenhum dos cortes dos dois cilindros, o caso foi excluído da análise para o respectivo marcador. O fato das reações terem sido feitas

simultaneamente para cada anticorpo uniformizou eventuais variações da intensidade de marcação.

A avaliação das reações IIQ levou em conta a intensidade de marcação (0- ausente, 1- leve, 2- moderada ou 3- forte) e a porcentagem de células marcadas (que variou de 0% – sem marcação a 100% - todas as células em questão marcadas).

A leitura das lâminas de IIQ foi realizada em microscópio óptico comum.

Exemplos de casos positivos e negativos para cada marcador são demonstrados nos resultados.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov para avaliar se os valores seguiam a distribuição normal e testes paramétricos (Anova), teste t de *Student* ou não paramétricos (Kruskal-Wallis e/ou Mann Whitney), conforme adequado. A associação entre variáveis foi avaliada pelo teste do qui quadrado ou exato de Fisher e correlação entre variáveis pela correlação de Pearson. Nível de significância bicaudal $\leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 FENOTIPAGEM DO MICROAMBIENTE (NOS CASOS DO MICROARRAY)

Selecionamos 11 tumores de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama, que estavam no Banco de Tumores (Biobanco) do A.C.Camargo Cancer Center.

Todas as amostras eram de pacientes menopausadas, com tumores ER (+), HER2 negativos, não submetidas a tratamento prévio com quimioterapia e/ou hormonioterapia. Foram cinco amostras classificadas como Luminal A e seis amostras classificadas como Luminal B.

Todas as amostras foram avaliadas através da leitura da lâmina corada por hematoxilina e eosina antes de serem cortadas para verificação da presença de estroma e realização da microdissecção a laser.

Foi realizado um estudo prévio com dois patologistas do departamento de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center para avaliar as melhores áreas a serem coletadas, sempre selecionando áreas mais enriquecidas por tecido epitelial e tecido estromal em contato próximo. O estroma das pacientes com câncer de mama é bastante heterogêneo, apresentando fibroblastos em diferentes fases de atividade (fibroblastos em repouso, fibroblastos ativados assim como o células inflamatórias) variados em relação à sua frequência e atividade (Figura 5).

Figura 5 - Estroma em câncer de mama. A e B: estroma rico em fibroblastos ativados e pobre em linfócitos. C: estroma com fibroblastos em repouso, repleto de colágeno maduro e raros linfócitos. D: estroma rico em fibroblastos e rico em linfócitos. Aumento 400X. A, B, C: Flecha no fibroblasto; D: flecha no linfócito.

Por este motivo, procuramos escolher criteriosamente os locais que pudessem melhor representar o estroma em atividade,. Buscamos áreas longe de vasos calibrosos e longe de áreas de intensa reação inflamatória e núcleos pequenos, pois poderia representar área enriquecida de células inflamatórias e não de fibroblastos.

4.2 PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS ESTROMAIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Nosso objetivo foi comparar a expressão gênica diferencial entre o estroma derivado de tumores de pacientes com câncer de mama subtipo Luminal A e estroma derivado de estroma de pacientes com câncer de mama subtipo Luminal B. Para isso, foi realizada microdissecção a laser para seleção de células estromais do tumores. A seguir, extraiu-se RNA e hibridizou-se o material em plataforma de microarray Agilent. Após leitura dos dados e normalização, foram selecionados 50% dos genes com maior variância. A expressão gênica diferencial foi determinada utilizando-se o teste SAM (significance analysis of microarrays) de duas classes não pareado (software TMEV), aceitando-se um FDR de 14,123. Desta maneira, foram identificadas 35 sequências diferencialmente expressas, todas mais expressas em amostras estromais de tumor luminal B, dentre as quais 16 genes conhecidos.

Análise de clusterização hierárquica seguida de “bootstrapping” indica que a expressão destes genes agrupa separadamente amostras de tumor luminal A e luminal B com 100% de confiabilidade (Figura 6).

Figura 6 - Dendograma de amostras estromais de câncer de mama luminal.

Cluster hierárquico de amostras de câncer de mama lumina A (A) e luminal B (B) de acordo com a expressão de 35 sequências diferencialmente expressos em células estromais. RNA foi obtido de células estromais de câncer de mama selecionadas por microdissecção a laser e hibridizado em plataforma Agilent. Colunas representam amostras e linhas representam expressão gênica. A clusterização hierárquica segundo a expressão diferencial de 35 sequências, usando a distância Euclidiana, separou as amostras em dois braços, com alta confiabilidade, avaliada por bootstrap e mostrada em cores dos ramos no topo da figura (amarelo e rosa: baixa confiabilidade; preto: alta confiabilidade)

Dentre os 16 genes diferencialmente expressos encontram-se: GCET2; BCL11B; C4orf7; CD3Z; LOC91316; ZBED2; NCR3; UBASH3A; KLRC4; PLA2G7; GZMB; ARPC1B; ZAP70; PACAP, CD38 e NTN2L (Quadro 3). Todos estes tiveram expressão gênica maior que 4 vezes em amostras luminal B em relação a Luminal A, incluindo nove cuja variação entre amostras foi maior que 10 vezes: ARPC1B, BCL11B, C4orf7, CD38, KLRC4, NTN2L, PLA2G7, UBASH, ZAP70.

Quadro 3 - Genes diferencialmente expressos entre células estromais de amostras de câncer de mama luminal A e luminal B. Luminal B x Luminal A, sendo que todos foram mais expressos nos tumores Luminal B. Teste SAM: FDR 14,123.

Gene (símbolo)	Gene (nome)	Variação de expressão (LumB/LumA)
KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4	31.19
NTN2L	netrin 3	24.34
ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	20.59
BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein	15.63
UBASH3A	ubiquitin associated and SH3 domain containing A	15.63
CD38	CD38 molecule	13.90
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma	11.73
ZAP70	zeta-chain (TCRassociated) protein kinase 70kDa	11.23
C4orf7	follicular dendritic cell secreted protein	10.08
GCET2	germinal center-associated, signaling and motility	9.47
ZBED2	zinc finger, BED-type containing 2	8.63
NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	8.08
GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1	7.51
LOC91316	glucuronidase, beta pseudogene 11	5.89
CD3Z	CD247 molecule	5.73
PACAP	adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary	4.46

Partimos então para a análise funcional dos genes. As categorias de processo biológicos enriquecidas nestes genes foram 13, todas relacionadas a processo imune (Quadro 4).

Quadro 4 - Funções enriquecidas em genes diferencialmente expressos entre células estromais de câncer de mama luminal A e luminal B. (<http://toppgene.cchmc.org/>)

	Nome do processo biológico	Valor de P	Genes
1	regulation of immune system process	7.315E-6	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z; PLA2G7; NCR3; ADCYAP1 (PACAP; GCSAM (GCET2; MZB1 (PACAP
2	antigen receptor-mediated signaling pathway	1.717E-3	ZAP70;CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z
3	immune response-activating cell surface receptor signaling pathway	2.589E-3	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z
4	positive regulation of immune system process	2.844E-3	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z; PLA2G7; NCR3
5	regulation of immune response	3.795E-3	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z; NCR3; ADCYAP1 (PACAP
6	immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway	4.250E-3	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z
7	positive regulation of immune response	8.962E-3	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z; NCR3
8	immune response	1.658E-2	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z; NCR3; ADCYAP1 (PACAP; GZBM
9	lymphocyte activation	2.439E-2	ZAP70; CD38; CD247 (CD3Z; BCL11B; MZB1 (PACAP
10	immune response-activating signal transduction	2.618E-2	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z
11	positive T cell selection	3.227E-2	ZAP70; BCL11B
12	immune response-regulating signaling pathway	3.557E-2	ZAP70; CD38; UBASH3A; CD247 (CD3Z
13	T cell receptor signaling pathway	4.488E-2	ZAP70; UBASH3A; CD247 (CD3Z

A Figura 7 mostra a significância estatística das funções analisadas.

Figura 7 - Processos biológicos enriquecidos em genes diferencialmente expressos entre células estromais de tumores luminal. A e luminal B. Coluna vermelha: número de genes diferencialmente expressos incluídos na função relacionada em processo biológico, que aparece na linha superior. Todos os genes foram mais expressos em tumores luminais B. A linha azul corresponde ao nível de significância, que aparece na linha inferior.

4.3 VALIDAÇÃO TÉCNICA

Como observamos perfil gênico diferencial característico de resposta imune na análise do microarray, utilizamos a técnica de IIQ para validar a presença de células relacionadas ao sistema imune (células de resposta inflamatória) nestas amostras. Para tal, realizamos a quantificação da presença de células inflamatórias nas amostras, sendo que determinamos a frequência em infiltrado inflamatório leve, moderado ou forte. A Tabela abaixo demonstra o padrão de infiltrado inflamatório e o subtipo tumoral das 11 pacientes avaliadas no *microarray*. Nesta fase do trabalho houve duas

amostras retiradas do serviço a pedido das pacientes e não pudemos estudá-las.

Quadro 5 - Análise de infiltrado inflamatório em HE (hematoxilina-eosinanas amostras usadas para o *microarray*).

CASO	SUBTIPO TUMORAL	INFILTRADO INFLAMATÓRIO
1	Luminal A	LEVE
2	Luminal A	LEVE
3	Luminal A	.
4	Luminal A	.
5	Luminal A	LEVE
6	Luminal B	MODERA
7	Luminal B	LEVE
8	Luminal B	FORTE
9	Luminal B	FORTE
10	Luminal B	MODERA
11	Luminal B	MODERA

Posteriormente, para caracterizar a qualidade deste infiltrado fizemos uma análise de marcadores que pudessem prever o tipo celular de cada amostra e sua quantificação. Estudamos: marcação para macrófagos e monócitos (CD68), linfócitos T (CD3), e linfócitos B (CD20).

O Quadro 6 demonstra que realmente houve marcação de células do sistema imune nas amostras avaliadas pelo *microarray*, e que houve heterogeneidade nos resultados. (Figuras 8, 9 e 10)

Quadro 6 - Expressão de marcadores de células de resposta imune em câncer de mama.

CASO	CD68	CD3	CD20
1	P2 I3 2:1 >100	P1 I 5%	P1 I1 1%
2	P2 I2 5:1 82	P1 I1 5%	P1 I1 1%
3	.	.	.
4	.	.	.
5	P2 I2 3:1 35	P1 I1 5%	P1 I1 5%
6	P2 I3 2:1 >100	P3 I3 10-50% heterogêneo	P2 I1 5%
7	P1 I2 3:1 36	P1 I1 5%	P1 I1 5%
8	P3 I3 2:1 95	P3 I2 10-60% heterogêneo	P3 I1 10%
9	P3 I3 3:1 79	P2 I2 10-30%	P2 I1 5%
10	P2 I2 3:1 85	P3 I3 10-60% heterogêneo	P2 I2 20%
11	P3 I1 10:1 80	P3 I1 5-50% heterogêneo	P1 I1 5%

Para o CD68 avaliou-se localização: (P) peritumoral (I)-intratumoral. Relação célula tumoral: macrófago e Contagem absoluta em um campo de 400x. Para CD3 e CD20 avaliou-se localização: (P) peritumoral (I)- intratumoral e porcentagem da célula estudada identificada na amostra.

Figura 8 - Expressão de CD20 e CD68 em câncer de mama. A: Expressão de CD20 em linfócitos B de tumor Luminal A (200x). B: Expressão de CD68 em monócitos/macrófagos de tumor Luminal A (400x). C- Expressão de CD20 em linfócitos B de tumor Luminal B (200x). D- Expressão de CD68 em monócitos/macrófagos de tumor Luminal B (400x)

Figura 9 - Expressão de CD20, CD68 e Vimentina em câncer de mama Luminal B. Expressão de CD20 em linfócitos B (aumento 200x); CD68 em monócitos/macrófagos (400x) e vimentina em fibroblastos (200x).

Figura 10 - Expressão de CD3 em linfócitos T de câncer de mama Luminal A e B. **A** - luminal A; **B** e **C**: Luminal B, duas amostras independentes. (aumento 200x nas 3 imagens)

Avaliamos também a expressão de ZAP70, um dos transcritos identificados como diferencialmente expressos entre células estromais de tumores luminais A e B e observamos que ela ocorre principalmente em linfócitos T CD3 positivos. (Figura 11)

Figura 11 - Expressão de ZAP70 em células do sistema imune de amostras de câncer de mama. (A) - Expressão de ZAP70 em tumor Luminal A, (B) - Expressão de ZAP70 em tumor Luminal B, (C) - Expressão de ZAP70 em tumor Luminal B

4.4 VALIDAÇÃO BIOLÓGICA

4.4.1 Casuística

Após identificarmos os 16 genes diferencialmente expressos entre as amostras de tumor Luminal A e Luminal B, partimos para um teste em outra amostra para que pudéssemos avaliar se estes genes teriam a mesma distribuição.

Incluímos nesta fase do trabalho mais 89 amostras escolhidas do arquivo de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center de pacientes com tumor RE+ e HER2- tratadas no hospital entre os anos de 2007 e início de 2008, o que nos daria pelo menos 5 anos de seguimento possível.

Não tínhamos conhecimento do número de Luminal A ou Luminal B, já que neste período a verificação de Ki67 não era rotina no serviço, sendo assim a pesquisa foi realizada nesta fase do estudo.

Após leitura do Ki67 no TMA observamos a distribuição dos casos de acordo com o perfil fenotípico dos tumores da seguinte forma: 67 casos Luminal A (75,28%), 19 casos Luminal B (21,35%) e em 3 casos (3,37) não foi possível estabelecer o perfil pelo fato de não conseguirmos avaliar o Ki67.

Figura 12 - Expressão de Ki67 em câncer de mama. (A e B)- tumor de baixo índice de proliferação (100x e 400x respectivamente), (C e D)- tumor de alto índice de proliferação (100x e 400x respectivamente).

Analizamos a distribuição dos casos de acordo com as variáveis clínicas e histopatológicas: idade estratificada (< 50 anos e ≥ 50 anos), estadiamento histopatológico, grau nuclear, grau de SBR modificado (Elston e Ellis 1991 - Anexo 3), invasão vasculosanguínea (IVS), invasão perineural (IPN) invasão vasculolinfática (IVL), tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, tratamentos realizados (quimioterapia e/ou radioterapia e estado da paciente na última consulta (SED - sem evidência de doença, MET- viva com doença recidivada metastática e OBI - Óbito)

Quarenta e sete pacientes encontravam-se com estadiamento patológico I (52,81%), 35 delas com estadiamento II (39,33%), 6 com estágio III (6,74%) e uma não avaliável (1,12%). Estadiamento anatomopatológico Anexo 4.

Todas as pacientes analisadas tiveram receptor de estrógeno e/ou progesterona positivos na peça cirúrgica ou na biópsia prévia ao tratamento cirúrgico realizado, no entanto 3 (3,37%) delas não fizeram uso de hormonioterapia, por recusar-se a usar a medicação ou por falta de prescrição já que na época do diagnóstico assumia-se que valores de $ER < 10\%$ eram negativos. Houve ainda mais 8 pacientes (8,99%), cuja análise de prontuário não referia qualquer informação quanto ao uso do fármaco.

Seguem na Tabela 1 as características clínico-patológicas e os dados de evolução e tratamento das 89 pacientes, cujos tumores entraram no estudo.

Tabela 1 - Características descritivas das pacientes selecionadas para análise de *tissue microarray* (TMA)

Características	Número de pacientes	(%)
Idade estratificada		
< 50 anos	25	28,09
≥ 50 anos	64	71,91
Estadiamento		
I	47	52,81
II	35	39,33
III	6	6,74
NA	1	1,12
Grau Nuclear		
1	8	8,99
2	31	34,83
3	50	56,18
Grau de SBR modificado Elston/Ellis, 1991		
I	22	24,72
II	45	50,56
III	22	24,72
Invasão vásculo-sanguínea (IVS)		
Não	86	96,63
Sim	2	2,25
NA	1	1,12
Invasão peri-neural (IPN)		
Não	78	87,64
Sim	10	11,24
NA	1	1,12
Invasão vásculo-linfática (IVL)		
Não	73	82,02
Sim	15	16,85
NA	0	1,12
Tamanho do tumor		
T1	47	52,81
T2	35	39,33
T3	6	6,74
NA	1	1,12
Comprometimento linfonodal		
pN0	61	68,54
pN+	27	30,34
NA	1	1,12
Quimioterapia		
Não	40	44,94
Sim	49	55,06
NA	0	0
Radioterapia		
Não	38	42,70
Sim	51	57,30
NA	0	0
Estado na última consulta		
Sem evidência de doença (SED)	81	91,01
Com metástase (MET)	4	4,49
Óbito (OBI)	4	4,49

Comparamos nossos dois grupos de estudo e na Tabela 2 encontram-se as características de ambos. O primeiro grupo teve seus tumores avaliados por estudo de microarray e o segundo grupo foi destinado para o teste de validação com *tissue microarray* (TMA), sendo que não houve diferença estatística entre a idade das pacientes nos dois grupos (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Idade das pacientes dos grupos de TMA e microarray. (Idade da paciente no momento da cirurgia). Boxplot apresenta a idade de todas as pacientes, linha dentro da caixa representa o valor mediano.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas das pacientes selecionadas para análise de *microarray* e *tissue microarray* (TMA).

	Grupo <i>microarray</i>	Grupo TMA	Valor de p	Teste
Idade (média)	60,27 ± 6,10	56,98	0,199	Mann Whitney
Grau Histológico				
I	2 (18,2%)	22 (24,7%)	0,891	Chi-quadrado
II	6 (54,5%)	45 (50,6%)		
III	3 (27,3%)	22 (24,7%)		
Estadiamento				
1	1 (9,1%)	47 (53,4%)	0,004	Fischer
2	10 (90,9%)	35 (39,8%)		
3	0 (0%)	6 (6,8%)		
Grau nuclear				
1	1 (9,1%)	8 (9,0%)	0,34	Chi-quadrado
2	6 (54,5%)	31 (34,8%)		
3	4 (36,4%)	50 (56,2%)		
Ki67				
< 13,25	5 (45,5%)	69 (80,2%)	0,02	Chi-quadrado
≥ 13,25	6 (54,5%)	17 (19,8%)		

Quanto às demais características, também observamos homogeneidade entre as amostras ao avaliar grau histológico (p: 0.891) e grau nuclear (p: 0.34). A maioria das pacientes apresentaram-se com estadiamentos iniciais, I ou II com ausência de casos estadio III na amostra do array. As amostras tiveram variação significativa entre Ki67, pois propositadamente desejamos obter um número maior de casos Luminal B nesta primeira fase do trabalho (p: 0.02).

4.4.2 Caracterização Fenotípica de Fibroblastos Estromais de Câncer de Mama: Expressão de AML, S100a4 E CAV1 (TMA)

A expressão de AML foi detectada em fibroblastos estromais de todos os tumores de mama, com exceção de um caso de tumor luminal B. A porcentagem de fibroblastos positivos nos tumores variou de 10-100% (mediana de 60%), sendo que em 70% dos tumores de ambos os subtipos, a intensidade de expressão foi de moderada a forte. Por outro lado, não se observou expressão de AML em células malignas.

De modo semelhante, a proteína S100A4 mostrou-se expressa por fibroblastos de todos os tumores de mama avaliáveis. Observou-se que a porcentagem de fibroblastos que expressa S100A4 variou de 10-100%, com mediana de 50% em tumores luminal A e 60% em luminal B. Além disso, em ambos os subtipos tumorais, detectou-se que mais de 50% dos fibroblastos apresenta forte intensidade de marcação. Quanto às células malignas, não se observou expressão de S100A4 em 75% dos tumores de ambos os subtipos. Nos 25% de tumores restante, a expressão percentual de S100A4 em células malignas mostrou-se variável, sendo que em 7% deles observou-se positividade em 100% das células malignas. Por outro lado, a intensidade de expressão de S100A4 em células malignas mostrou-se sempre baixa.

A expressão de CAV1 foi detectada em fibroblastos estromais da quase totalidade dos tumores de mama, exceto um caso de tumor luminal A e um caso de Luminal B. A porcentagem de fibroblastos positivos nos tumores variou de 10-90% (mediana de 20% em tumores luminais A e 30% em luminais B), sendo que cerca de 25% dos tumores apresentam

positividade de CAV1 em 10% dos fibroblastos. A intensidade da expressão de CAV1 nos fibroblastos foi leve em cerca de metade e forte em cerca de 12% dos tumores de ambos os subtipos. Em células malignas, não se observa a expressão de CAV-1.

Seguem figuras que demonstram a marcação imunoistoquímica em diferentes amostras estromais. (Figuras 13,14 e 15)

Figura 13 - Expressão de actina de músculo liso em fibroblastos estromais do câncer de mama luminal. (A e B AML intensidade fraca, C- AML intensidade forte) Aumento 400x.

Figura 14 - Expressão de S100A4 nos fibroblastos do estroma de câncer de mama luminal. A- S100 negativo, B- intensidade fraca, C- intensidade forte. Aumento 400x.

Figura 15 - Expressão de CAV1 em fibroblastos do estroma de câncer de mama luminal. A e B: intensidade fraca; C- intensidade forte. Aumento 400x

4.4.3 Análise dos Marcadores Estromais (AML, S100A4 e CAV1) Expressos por TMA

Utilizando-se o histoscore, que considera a porcentagem de células que expressam o marcador e a intensidade da marcação, observamos que não houve diferença de expressão protéica de AML, S100A4 e CAV1 entre tumores Luminal A ou B. (AML: $p=0,888$; S100A4: $p=0,520$; CAV1: $p=0,846$; Teste de Mann-Whitney). (Gráfico 2). Além disso, realizando-se a distribuição espacial dos tumores de acordo com a expressão destas proteínas não se observa separação das amostras de acordo com o subtipo luminal A e B (Figura 16). Além disso, o dendograma de distribuição das amostras, de acordo com a clusterização hierárquica, mostra grande heterogeneidade na expressão destes três genes, resultando em vários grupamentos (Figura 17).

Gráfico 2 - Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal A e luminal B. (Expressão protéica pelo Histo Score-HS (de 0 a 300, Luminal A e Luminal B

Figura 16 - Distribuição tridimensional dos tumores de acordo com a expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais. Expressão protéica avaliada segundo histoscore, variando de 0 a 300. Círculos azuis: luminal A; círculos verdes: luminal A.

Figura 17 - DENDOGRAMA da distribuição dos tumores luminais A e B segundo a expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais. Os tumores foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal. A dimensão da linha horizontal da grade representa a similaridade entre tumores quanto à expressão dos três genes. Quanto menor a linha horizontal maior a similaridade da expressão dos genes entre os tumores e vice versa. Observa-se a formação de quatro braços incluindo tumores luminal A e B indistintamente.

Quando avaliamos uma possível associação dos marcadores (α -actina de músculo liso – AML; S100A4 e Caveolina 1– CAV1) com características clínico-patológicas não encontramos diferença de distribuição quando avaliamos grau histológico de SBR, grau nuclear, comprometimento linfonodal axilar e estadiamento patológico como pode ser observado nos gráficos a seguir. (Gráficos 3 a 6)

Gráfico 3 - Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao grau histológico (SBR dos tumores). (Expressão protéica pelo Histo Score- HS (de 0 a 300, Grau histológico (1 – grau de SBR I, 2 – grau de SBR II e 3 – grau de SBR III).

Não houve expressão protéica diferencial de AML, S100A4 e CAV1 de acordo com o grau histológico (Teste de Kruskal Wallis, sendo p de AML: 0,994; p de S100A4: 0,912; p de CAV1: 0,879).

Gráfico 4 - Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao grau nuclear dos tumores. (Expressão protéica pelo Histo Score- HS (de 0 a 300, Grau nuclear (1 – grau nuclear 1, 2 – grau nuclear 2 e 3 – grau nuclear 3)).

Não houve correlação entre expressão protéica de AML, S100A4 e CAV1 e grau nuclear (Teste de Kruskal Wallis, sendo p de AML: 0,835; p de S100A4: 0,402; p de CAV1: 0,830).

Gráfico 5 - Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao comprometimento linfonodal axilar. (Expressão protéica pelo Histo Score- HS (de 0 a 300, Comprometimento linfonodal – LN (ausência de linfonodos axilares comprometidos por tumor e LN (+)presença de linfonodos axilares comprometidos por tumor

Não houve correlação entre expressão protéica de AML, S100A4 e CAV1 e ausência de comprometimento linfonodal (LN-ou presença de comprometimento linfonodal (LN+(Teste de Mann-Whitney p de AML: 0,175; p de S100A4: 0,437; p de CAV1: 0,121).

Gráfico 6 - Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao estadiamento patológico. Expressão protéica pelo Histo Score- HS (de 0 a 300), Estadio patológico (1- estágio I, 2- estágio II ou 3- estágio III).

Não houve diferença de expressão protéica de AML, S100A4 e CAV1 e entre os diferentes estadiamentos patológicos (Teste de Kruskal Wallis, sendo p de AML: 0,514; p de S100A4: 0,227; p de CAV1: 0,754).

Analizamos o status da paciente na data da última consulta (SED- sem evidência de doença, MET - com metástase ou OBI - óbito pela doença) para observar se havia expressão diferencial de AML, S100A4 ou CAV1 e não encontramos alterações significativas (Teste de Pearson, sendo p de AML: 0,859; p de S100A4 de 0,845 e p de CAV1 de 0,665)

Buscamos a correlação entre a expressão dos três marcadores com o infiltrado inflamatório presente nas amostras do microarray, pois os genes alvos tiveram um enriquecimento de funções imunes, mas não encontramos significância estatística nesta nova amostra como demonstrado a seguir.

Gráfico 7 - Expressão de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de câncer de mama luminal em relação ao infiltrado inflamatório. Expressão de AML, S100A4 e CAV1 de acordo com a presença de inflamatório (0- ausente, 1- leve, 2- moderado, 3- intenso)

Não houve correlação entre expressão protéica de AML, S100A4 e CAV1 e infiltrado inflamatório (Teste de Kruskal Wallis, sendo p de AML: 0,133; p de S100A4: 0,217; p de CAV1: 0,305).

Ao analisar a presença de infiltrado inflamatório nos dois subgrupos de pacientes, Luminal A e Luminal B, utilizando-se a graduação ausente, leve, moderado e intenso, observamos que não houve diferença estatística entre os subtipos como demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 3 - Número de tumores luminais A e B de acordo a presença de infiltrado inflamatório, graduado como ausente, leve, moderado e intenso nas amostras do TMA. (teste Chi-quadrado, p: 0.883)

	Luminal A – N %	Luminal B – N %
Infiltrado inflamatório ausente – 0	11 (16,4%)	4 (21,1%)
Infiltrado inflamatório leve – 1	42 (62,7%)	10 (52,6%)
Infiltrado inflamatório moderado – 2	9 (13,4%)	3 (15,8%)
Infiltrado inflamatório forte – 3	5 (7,5%)	2 (10,5%)

Quando agrupamos de forma diferenciada as variáveis, assumindo que a influência do infiltrado, ausente ou leve, pudessem interferir nos resultados de forma diferente do infiltrado moderado ou grave, também observamos que não houve diferença estatística entre os dois grupos. (Tabela 4)

Tabela 4 - Frequência e porcentagem de infiltrado inflamatório (agrupados nas amostras do TMA (teste Chi-quadrado, p: 0,615

	Luminal A – N %	Luminal B – N %
Infiltrado inflamatório ausente ou leve	53 (79,1%)	14 (73,7%)
Infiltrado inflamatório Moderado ou forte	14 (20,9%)	5 (26,3%)

4.5 EXPRESSÃO PROTEICA DE ZAP70 NAS CÉLULAS ESTROMAIS

A expressão de ZAP70 não foi detectada em fibroblastos estromais de câncer de mama. Em células malignas a expressão de ZAP70 foi ausente em 80% dos tumores tanto luminais A quanto luminais B. Nos restantes 20% dos tumores a expressão de ZAP70 pode ser detectada em 10-100% das células malignas, sempre de intensidade leve e de modo similar em tumores luminais A e B.

Avaliou-se então a expressão de ZAP70 em células malignas em relação à presença de infiltrado inflamatório, utilizando-se o histoscore. Observa-se na figura, uma tendência a maior expressão de ZAP70 em células malignas de tumores com infiltrado inflamatório ausente ou leve ($p=0,087$, teste de Mann Whitney) e a análise dos resultados demonstra que o ZAP70 apresentou uma marcação semelhante ao CD3, ou seja comparável com a marcação dos Linfócitos T. (Gráfico 8)

Gráfico 8 - Expressão de ZAP70 em células epiteliais de câncer de mama luminal em relação à presença de infiltrado inflamatório. (0-1: ausente ou leve; 2-3: moderado ou intenso)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A conduta médica para as pacientes com diagnóstico de câncer de mama continua sendo baseada em informações clínico-patológicas, no entanto, a cada dia novas perspectivas e novos testes moleculares são adicionados na prática clínica com o objetivo de melhorar o tratamento destas pacientes. Estas melhorias se baseiam nos estudos de microarray, descritos inicialmente por Perou et al. em 2000 que separou grupos distintos por sua expressão gênica principalmente pelas diferenças de prognóstico. No entanto, apesar dos benefícios que esta descoberta nos trouxe ainda hoje a técnica de microarray não é amplamente disponível, e apesar de haver uma grande concordância entre os vários testes existentes há pacientes que apresentam resultados e evoluções incertas (Fan et al., 2006).

Por este motivo, mesmo após mais de uma década desta tecnologia, busca-se ainda fatores que possam prever com melhor detalhe a evolução das mulheres com diagnóstico de câncer de mama.

O microambiente tumoral é formado pelas células epiteliais tumorais, e por estroma especializado, rico em células inflamatórias e fibroblastos, ambos expressando componentes de matriz extracelular (MEC) e fatores de crescimento. Os estudos iniciais de Perou et al. em 2000 utilizaram a técnica de microarray com pesquisa de tumor total, que incluía epitélio e estroma, mas davam ênfase à célula epitelial, principal componente dos tumores de mama.

Em 2008, Finak et al. em um estudo que microdissecava o estroma, observou que havia uma assinatura estromal que diferenciava tumores de bom e mau prognóstico.

Com a identificação desta nova linha de pesquisa, baseada no estroma, em 2008 Bergamaschi et al. identificaram que quando tumores de mama são avaliados baseando-se somente em seu estroma, assinaturas distintas também são identificadas. Isto demonstrou que há influência do microambiente estromal sobre o comportamento das células tumorais do câncer de mama; influência esta também descrita por vários outros estudos (Allinen et al., 2004; Singer et al., 2008; Bauer et al., 2010). E sabe-se ainda que há diferenças na expressão gênica entre os fibroblastos normais e fibroblastos associados ao tumor (CAFs), bem como diferenças de resposta das células tumorais quando co-cultivadas com fibroblastos normais ou estes CAFs (Angelucci et al., 2012).

A interdependência entre célula tumoral e estroma foi reforçada por estudos em modelos animais que demonstrou que a perda de um gene supressor (PTEN) nos CAFs altera vias de sinalização nesta célula, assim como altera a sinalização nas células tumorais adjacentes (Wallace et al., 2011). Esta evidência levou à hipótese de que a colaboração entre o compartimento epitelial e estromal, ou seja esta assinatura estromal contribui para a diversidade biológica do câncer de mama e do seu prognóstico, como descrito inicialmente por Finak et al. (2008).

Além destas descobertas, observou-se ainda que assinaturas estromais específicas foram observadas em pacientes afro-americanos

quando comparadas a pacientes de descendência europeia-americana (Martin et al., 2009) e ainda que assinaturas estromais foram relatadas como capazes de prever resposta à quimioterapia (Farmer et al., 2009).

Nestes trabalhos inicialmente citados, os pacientes não foram estratificados pelo subtipo tumoral, mas Bianchini et al. em 2010 demonstraram diferenças entre genes estromais determinados em tumores de subtipos distintos com grandes diferenças de evolução clínica. Em um estudo que avaliou tecidos derivados de punção biópsia por agulha fina e agulha grossa, cuja diferença principal das amostras era a quantidade de tecido estromal no tumores ER(+) e ER(-), observaram uma lista de 293 genes que diferenciavam estes dois subtipos. Algo confirmado em outro estudo de subtipos diferentes realizado por Camp et al. em 2011, que em estudos por co-cultura identificaram expressões gênicas distintas entre tumores basais e luminais.

Em função destes resultados sugerimos a hipótese de que o microambiente de tumores luminais (ER+, HER2-), divididos em dois grupos (baixos níveis de proliferação-Luminal A e elevados níveis de proliferação-Luminal B deveriam exibir diferentes perfis gênicos. Ambos são luminais, mas apresentam evoluções clínicas distintas e respostas ao tratamento variadas.

Para a verificação de nossa hipótese testamos a expressão gênica no estroma microdissecado destes 2 subtipos em 11 amostras de câncer de mama. O estroma foi selecionado através da microdissecção a laser em 6 casos Luminal A e 5 casos Luminal B, usando análise de microarray.

Este estudo é original, pois estuda tecido estromal microdissecado de dois subtipos luminais puros, diferentes em suas características clínico patológicas e prognóstico, e que não tem estudo similar na literatura até o momento. Os três estudos nesta área, que realizaram microdissecção de estroma tiveram outras abordagens. O primeiro deles estudou a progressão tumoral avaliado pela caracterização do tecido estromal de CDIS e CDI (Ma et al., 2009). O segundo avaliou o agrupamento de genes de melhor ou pior prognóstico em tumores sem seleção de subtipos (Finak et al., 2008) e um terceiro estudou estroma normal versus estroma tumoral de 6 amostras de tumor de mama e os comparou com outras amostras de tumor de próstata (Planche et al., 2011).

Verificamos que um perfil de 16 genes discriminou adequadamente o estroma de tumores luminais A e B, sendo que houve um enriquecimento de genes relacionados a processos imunes. Nestas amostras, além da caracterização descrita em literatura para a diferença entre tumores Luminal A versus Luminal B, onde a avaliação do grau nuclear, grau histológico e níveis de Ki67 são importantes, pudemos também avaliar a quantidade de tecido inflamatório contido em cada tumor.

Observamos que os índices de proliferação (Ki67) e grau histológico separavam bem as amostras, mas também observamos que apesar de não ser nosso objetivo inicial o estudo das células inflamatórias nestes tumores, os níveis de infiltrado inflamatório também eram bastante diferentes nestes dois grupos. As pacientes definidas como Luminal A apresentavam padrão de inflamação leve e as pacientes com tumores Luminal B níveis leve,

moderado ou forte, sempre baseado na análise da quantidade de células de resposta imune no material.

Pudemos observar que nestas amostras selecionadas para o estudo de microarray houve uma quantidade expressiva de macrófagos e monócitos, assim como de linfócitos B e T. Ou seja, mesmo havendo a preocupação de excluir as regiões enriquecidas de linfócitos, monócitos e macrófagos no momento da microdissecção estas células estavam presentes em proporções variadas e não insignificantes. Este dado demonstra a dificuldade em excluir das análises as células inflamatórias, e corrobora com os dados de literatura descritos no trabalho de Bianchini et al. (2008) que demonstraram que mesmo quando há pouco tecido estromal nas amostras de punção por agulha fina, há uma variação de 0 a 70% de células linfóides nas amostras analisadas. E talvez este grupo de células sejam realmente importantes na evolução das pacientes.

Em 2011, Reis-Filho e Pusztai descreveram uma segunda geração de assinaturas de prognóstico. Relataram que a maioria dos genes diferencialmente expressos quando se estuda os tumores ER+ são relacionados ao controle do ciclo celular e à proliferação, no entanto quando se estuda os ER- há diferentes resultados, variados de acordo com a análise de distintos bancos de dados. Observaram ainda que estudos mais recentes têm demonstrado que tumores ER- e tumores ER+ com elevada taxa de proliferação apresentam expressão de genes relacionados à resposta imune com importante correlação com prognóstico.

Esta evidência de que a concentração de infiltrado inflamatório pode prover informação independente sobre prognóstico das pacientes é de extremo valor, já que através do estudo de imunoistoquímica uma amostra pode ser estudada sem grande dificuldade. Em nosso trabalho, apesar de termos escolhido criteriosamente áreas enriquecidas em células estromais, observamos que a maioria das pacientes Luminal A tinham menor concentração de infiltrado inflamatório que as pacientes Luminal B. Houve ainda a observação de que nestas amostras os linfócitos T eram mais preponderantes que os linfócitos B em uma relação de 10:1, e também com uma proporção muito heterogênea intratumoral, variando de 10 a 60% de infiltração a depender da área estudada. Desta forma, a superexpressão de genes da resposta imune em nossa amostra poderia ser explicada pelo fato destes tumores apresentarem uma infiltração de linfócitos significativa e não previamente descrita.

A maioria dos genes identificados em nosso trabalho foram funcionalmente classificados como pertencentes ao sistema imune e focalizados na resposta citotóxica à célula T e atividade do NK (natural killer). E como houve maior expressão nos casos Luminal B, que tendem a apresentar maiores taxas de recorrência, há concordância com a literatura que refere a recorrência do câncer de mama pode advir da influência direta do sistema imune do hospedeiro (paciente com tumor) (Kurt et al., 1998).

Entre os genes identificados, KLRC4 (NKG2F) foi o gene com maior expressão no subgrupo B comparado ao A, com expressão 31,19 vezes maior na análise de frequência de expressão. A família dos receptores

NKG2 consiste de moléculas transmembrânicas tipo II, lectinas do tipo C que exercem importantes papéis na regulação das funções do natural killer (NK contra tumores e vírus). NKG2F é expresso na superfície de células sanguíneas NK e pode ser regulada de forma positiva por estimulação com IL2 ou IL15 (Huang et al., 2010). Foi descrito como um gene de regulação imune na leucemia linfóide crônica, mas nunca foi citado em correlação com câncer de mama (Sellick et al., 2008).

Outro gene com grande diferença de expressão (24,34 vezes foi a netrina 3 (NT3 ou NTN2L), caracterizada como uma molécula de axon guidance (AGMO) papel desta molécula está na regulação da morfogênese e no desenvolvimento dos órgãos, e sua freqüente desregulação durante a tumorigênese e progressão tumoral no câncer de mama sugere que a AGM podem exercer um papel de oncogene nestes tumores (Harburg e Hinck 2011).

O gene ARPC1B (aumentado 20.59 vezes) em fibroblastos de tumores B é um ativador de Aurora A no centros soma iniciado a mitose (Molli et al., 2010). Em estudos de melanoma de coróide foi descrito como sendo produtor de um complexo que aumenta a mobilidade celular, causa resistência à radioterapia e estimula a progressão de metástases (Kumagai et al., 2006). Em câncer de pâncreas, está presente em menores valores, no entanto outras duas subunidades também relacionadas, ARPC2/3 quando silenciados reduzem a capacidade migratória destes tumores (Rauhala et al., 2013). Em câncer de mama nunca foi descrito, no entanto poderia ser motivo

de estudo no subtipo Luminal B que apresenta maior número de casos de metástase em relação aos Luminal A (Cheang et al., 2009).

Outro dos genes diferencialmente expressos é o BCL11b (B-cell linfoma 11B). Este gene é responsivo ao estrógeno, tendo sido descrito como supressor em câncer de mama e associado a tumores ER+ (Kominami et al., 2012; Fenne et al., 2013). No entanto, na literatura é descrito como indutor de proliferação quando sua expressão é menor, o que não representa o nosso resultado, pois estava superexpresso nos tumores Luminal B.

UbaSH3A (TULA, T-cell Ubiquitin ligand) também com superexpressão em estroma de pacientes com câncer de mama Luminal B codifica a proteína UbaSH3A que exibe uma combinação de domínios conservados: Uba, SH3 e histidina fosfatase. A proteína TULA exibe atividade de fosfatase que é essencial para o efeito supressivo na sinalização das células T (Tsygankov 2013). Não há relação deste gene com o câncer de mama, no entanto está descrito juntamente com outro gene também identificado em nossa casuística (GZMB) à doenças autoimunes e predisposição ao melanoma (Jin et al., 2010).

CD38, estava 13 vezes mais expressa nos tumores Luminal B que no Luminal A. É uma ectoenzima multifuncional, amplamente expressa em células e tecidos, especialmente nos leucócitos. Tem função de adesão celular, transdução de sinal e sinalização de cálcio. No câncer de intestino é expressa em frequência variada com uma tendência a reduzir sua expressão

conforme o tumor progride (Perenkov et al., 2012). No câncer de mama não há referência.

Outros genes superexpressos relacionaram-se a atividades associadas ao aumento de proliferação. A fosfolipase 2, grupo VII (PLA2G7) é um biomarcador seletivo em câncer de próstata, associado à proliferação e doença agressiva (Vainio et al., 2011). Também não há referência deste gene no câncer de mama.

ZAP-70, também estava 11 vezes mais expresso em nossa amostra. Este gene codifica uma proteína com atividade de tirosina quinase que é essencial para a sinalização das células T, ou seja, quando está reduzida cria uma inabilidade das células T em responderem ao estímulo antigênico (Kurt et al., 1998). Em leucemia linfóide crônica, juntamente com a expressão de CD38 demonstram relação com pior prognóstico quando superexpressas (Rosenquist et al., 2013).

O gene C4orf7 estava dez vezes mais expressos nas pacientes Luminal B que nas Luminal A. Também conhecido como FDC-SP (proteína secretada de células dendríticas foliculares, este gene tem sido descrito como um gene presente em pacientes com câncer, sendo que sua maior expressão é nos pacientes com metástases. Parecendo ter importante papel na oncogênese do câncer de mama (Wu et al., 2010). In vitro foi descrito como up-regulado em linhagens de câncer de ovário associado à motilidade e invasão (Wang et al., 2010).

Notamos ainda aumento de expressão do gene GCET2 (germinal centre-associated lymphoma expresso no centro germinativo dos

linfócitos B, codificando uma proteína que regula a sinalização do receptor de células B nos linfócitos B, podendo levar a uma linfoproliferação (Romero-Camarero et al., 2013). Não há referência deste gene em câncer de mama.

O gene NCR3, codifica uma proteína que é capaz de se juntar à célula Natural Killer (NKe degradar células tumorais (Fiegler et al., 2013). Não há referência sobre esta proteína e o câncer de mama até o presente momento.

O gene GZMB foi 7,5 vezes mais expresso nos tumores Luminal B que no A e juntamente com outros genes (CD19, CD3D, CD48, LCK, MS4A1, PRF1 e SELL) foram descritos nos tumores ER- como preditores de resposta à quimioterapia com antracíclicos (West et al., 2011).

Outros genes descritos em nossa casuística como mais expresso nos tumores luminal B foram o CD3Z, relacionado na literatura aos gliomas (Wiencke et al., 2012); o PACAP (peptídeo ativador da pituitária adenilato ciclase) descrito em leucócitos de pacientes com câncer de mama, e envolvido na transformação das células em tumor (García-Fernandez et al., 2005) e outros (ZBED2, LOC91316) sem referência qualquer na literatura.

Dentre os genes identificados em nossa amostra, selecionamos aqueles com maior diferença de expressão, cuja proteína apresentava anticorpo comercial para validar nossos resultados em outro grupo de pacientes. Os genes escolhidos foram: Zap70, BCL11b, NCR3/NTN2L, PLA2G7, ZBED2 e UBASH3A.

Para a validação escolhemos a metodologia do *tissue microarray* que possibilita a avaliação de grande número de amostras e dá a possibilidade

da leitura única comparativa em uma mesma abordagem (Andrade et al., 2007).

Selecionamos um grupo de 89 pacientes, que diferiram do grupo do microarray em relação ao número e proporção de casos Luminal A e Luminal B, mas que refletem muito melhor a realidade das pacientes com câncer de mama, ou seja, a maior parte das pacientes era Luminal A.

O estudo de acompanhamento destas pacientes demonstrou que 6 pacientes Luminal B (31,57%) de 19 seguidas apresentaram metástase contra 1 paciente (1,12%) de 89 seguidas no grupo Luminal A, demonstrando similaridade aos dados de literatura que indicam o pior prognóstico nas pacientes com tumores Luminal B.

Estudamos nesta nova amostra a quantidade de infiltrado inflamatório, mas diferentemente da clara separação encontrada no grupo do microarray, neste novo grupo não houve diferença estatística entre o infiltrado inflamatório e os subtipos Luminal A ou B.

Sabemos que o microambiente tumoral é composto em sua grande maioria por fibroblastos e que estes fibroblastos associados ao tumor (CAFs) são uma população celular heterogênea em relação à frequência e qualidade. Estes CAFs expressam diferentes marcadores, e não há marcador específico que os defina, mesmo a vimentina, freqüentemente utilizada como marcador de fibroblasto não é 100% expressa nestes tipos celulares. Quando analisamos a proporção de células fibroblastóides marcadas com vimentina em determinado tumor observamos que variou de 10 a 60% dentre as amostras selecionadas para estudo por *microarray*.

De acordo com nossos resultados, estudo de Tchou et al. em 2012 evidenciou que CAFs derivados de tumores de diferentes subtipos exibem perfis gênicos específicos, evidenciando que o perfil gênico de CAFs derivados de tumores HER2+ é significativamente diferente de CAFs derivados de tumores ER positivos ou triplo negativos, confirmando a heterogeneidade de CAFs nos diferentes subtipos, mas neste trabalho foram estudados 7 tumores ER (+) sem definição se eram Luminal A ou Luminal B. Esta heterogeneidade pode ser ocasionada pelos efeitos epigenéticos da célula tumoral adjacente ou por uma população diferente de CAFs demonstrada por diferentes marcadores que se associam a cada fenótipo (Sugimoto et al., 2006).

Além desta heterogeneidade de marcação, ainda não ficou estabelecido se diferentes tipos de fibroblastos apresentam diferenças funcionais em relação à influência no crescimento e metástase das células tumorais, assim como não sabe se esta heterogeneidade é consequência da origem dos CAFs.

Algumas hipóteses tentaram estabelecer esta origem e CAFs parecem se originar de vários compartimentos:

- 1 Fibroblastos residentes, em contato com células tumorais tornaram-se ativados passando a expressar marcadores específicos de miofibroblastos como a actina de músculo liso (α SMA) (Kalluri e Zeisberg 2006;

- 2 Células epiteliais ou endoteliais, dentro do tumor podem se transdiferenciar em células mesenquimais (transição epiteliomesênquima);
- 3 Células tronco mesenquimais (derivados da medula óssea) recrutadas para o sítio tumoral e 20 – 40% destas células influenciadas pelo tumor dão origem aos CAFs, expressando marcadores de ativação como S100A4 e α SMA.

Desta forma, optamos por caracterizar os fibroblastos dos tumores Luminal A e Luminal B de nossa amostra de validação.

Os marcadores escolhidos formam: α SMA (AML), S100A4 e Caveolina 1 (CAV1).

Durante a tumorigênese, fibroblastos adquirem algumas características de células musculares lisas, definidas primariamente pela expressão de AML. Estes fibroblastos, denominados originalmente de miofibroblastos ou CAFs, produzem grande quantidade de colágeno e outros componentes da matrix, dando ao carcinoma de mama características de lesão desmoplástica (Eyden 2008). Fibroblastos expressando AML foram sugeridos como importantes no processo de invasão estromal (De Wever e Mareel 2003). No entanto, apesar de descritos como sendo promotores do desenvolvimento dos tumores, nem todos os fibroblastos associados ao tumor expressam AML, confirmando a heterogeneidade nesta população celular (Micke e Ostman 2004).

A proporção de positividade de AML identificada no presente estudo nos fibroblastos estromais foi similar entre os grupos luminal A e B e

confirmou a frequência encontrada em publicações prévias sobre câncer de mama (Holliday et al., 2007; Toullec et al., 2010; Yamashita et al., 2012).

Yamashita et al. em 2012 quantificou a expressão de AML como um marcador de miofibroblastos no câncer de mama invasivo e não encontrou diferenças entre expressão de AML e características clínico-patológicas, assim como obtivemos em nossos resultados.

O próximo marcador de fibroblasto escolhido foi o S100A4, que pertence à família das pequenas proteínas ligadoras de Ca^{2+} . Tem sido descrito como estando associada a metástase por interferir em adesão, motilidade e invasão. A proteína S100A4 está marcadamente aumentada em fibroblastos ativados tanto em condições normais (cicatrização de lesões) como estroma tumoral em contraste aos fibroblastos normais e a co-cultura de fibroblastos e células tumorais estimula a liberação da S100A4 dos fibroblastos (Grum-Schwensen et al., 2005).

No entanto aS100A4 não é exclusiva de fibroblastos e também foi identificada células imunes no microambiente do câncer de mama (O'Connel et al., 2011), mas somente as células não imunes contribuíram para a colonização metastática via produção de proteínas da matrix e secreção de fatores de crescimento como VEGF-A e tenascina C. Estes estudos indicaram então que a S100A4 contribui para a progressão tumoral, criando um microambiente favorável à invasão, aumentando a motilidade dos fibroblastos.

No nosso estudo, a proteína S100A4 expressou-se em quase a totalidade das células estromais, não sendo possível confirmar pelo pequeno

número de metástases encontradas (7 em 89 casos) possamos definir que esta proteína tenha sido mais encontrada em associação com a doença avançada.

E o último marcador que pesquisamos em nossa amostra foi a Caveolina-1 (CAV1). A CAV1 é a principal proteína estrutural que cobre invaginações da membrana plasmática denominadas caveolas. A expressão de caveolina está diminuída em vários tipos de tumor e pode funcionar como um gene supressor (Chiu et al., 2011). Também foi identificada como um biomarcador estromal e a perda de caveolina em fibroblastos associados ao tumor (CAFs) relaciona-se com progressão tumoral, receptores de estrógeno negativos e diminuição de sobrevida (Mercier et al., 2008; Witkiewicz et al., 2009; Sloan et al., 2011).

Fibroblastos deficientes em caveolina exibem características de miofibroblastos e superexpressam um certo número de proteínas marcadoras de miofibroblastos (Pavrides et al., 2009) tais como α SMA e tropomiosina, além de apresentarem indução dos ligantes de TGF β e respectivos genes responsivos (TGF β 2/3, procolágeno, interleucina 11 e CTGF).

O mecanismo da perda da caveolina estromal permanece pouco claro. Durante a formação do tumor, células tumorais e estromais adjacentes estão acopladas metabolicamente. Um novo modelo foi proposto no qual CAFs glicolíticos promovem crescimento tumoral secretando metabólitos energéticos que podem ser utilizados pelas células tumorais. A perda de caveolina media uma degradação autofágica que fornece aminoácidos

essenciais à célula tumoral e as protege contra apoptose (Martinez-Outschoorn et al., 2010).

No presente estudo avaliamos a expressão de CAV-1 no estroma de carcinomas invasivos em relação à variação da presença de Ki67 e determinamos uma tendência entre perda de caveolina e aumento da expressão de Ki67, ou seja, aparentemente tumores luminais B exibem uma menor expressão de caveolina, embora sem atingir significado estatístico, mas sugerindo um comportamento biológico de tumores B mais agressivo que o A.

Examinando a associação da perda da expressão de caveolina com variáveis clínico patológicas não encontramos correlação embora estas tivessem sido anteriormente relatadas em séries maiores de câncer de mama independentemente de subclasses, enfatizando que a ausência de caveolina no estroma tumoral associa-se a um comportamento agressivo (Witkiewicz et al., 2009; Simpkins et al., 2012).

Finalmente iniciamos a análise dos genes diferencialmente expressos na amostra do microarray nesta nova amostra de *tissue microarray*.

Quando avaliamos o ZAP70 pelo *tissue microarray* não houve marcação imunoistoquímica em fibroblastos do estroma destas pacientes. A marcação identificada foi somente nos linfócitos presentes na amostra, o que nos fez supor que a expressão gênica deste gene tenha representado a infiltração de células inflamatórias, principalmente linfócitos T nas 11 pacientes inicialmente selecionadas. Avaliação da expressão imunistoquímica dos outros genes candidatos será avaliada a seguir.

Em relação à expressão dos genes candidatos e recidiva tumoral, talvez a observação mais prolongada das pacientes da validação seja necessária, pois para tumores Luminais, onde a recorrência é mais indolente e tardia, o acompanhamento por 5 anos não é suficiente para encontrar variáveis que modifiquem nossos resultados.

Em resumo este trabalho compara diretamente a expressão gênica células estromais, obtidas por microdissecção, de câncer de mama padrão Luminal A e Luminal B. Apesar de apresentar um pequeno número de casos a amostra de pacientes com tumores Luminal A e Luminal B foi bastante homogênea, incluindo apenas carcinoma ductal invasivo, HER2 negativo, estágio inicial (I/II) e não há na literatura trabalho com esta mesma abordagem. Observamos que os genes diferencialmente expressos estão relacionados ao sistema imune. Caracterizamos os fibroblastos quanto à expressão de α actina de músculo liso, proteína S100A4 e caveolina-1, mas não observamos diferenças entre tumores luminais A e B. Também não observamos diferença quanto à presença e intensidade de infiltrado inflamatório entre os subtipos tumorais. Nossos resultados indicam que seria importante a melhor caracterização do tipo celular e estado de ativação do infiltrado inflamatório dos tumores luminais.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

1. Identificamos um perfil transcricional diferencial de células estromais de câncer de mama entre os subtipos luminal A e luminal B, constituídos por 35 sequências incluindo 16 genes conhecidos, todos mais expressos no subtipo luminal B, a maioria deles relacionado a controle do sistema imune. Observamos que no estroma de tumores luminais B existe uma infiltração inflamatória heterogênea, em algumas regiões ricas em linfócitos T CD3(+) e/ou monócitos/macrófagos CD68(+). A expressão imunoistoquímica de ZAP70 (mais expresso em tumores luminal B) parece relacionada à presença de células T.
2. A expressão de AML, S100A4 e CAV1 foi detectada em fibroblastos estromais de praticamente todas as amostras de câncer de mama. Nestas células, a intensidade de expressão de AML e S100A4 foi de moderada a forte e de CAV1 foi leve. Não houve diferença na expressão destas proteínas em subtipos luminais A e B. A expressão protéica de ZAP70 foi ausente em fibroblastos de tumores luminais A e B. A presença de infiltrado inflamatório não variou entre tumores de subtipos luminal A e B.
3. Não houve expressão diferencial de AML, S100A4 e CAV1 em fibroblastos estromais de acordo com grau histológico do tumor, comprometimento linfonodal, estadiamento clínico e seguimento das pacientes em 5 anos.

ANEXOS

Anexo 1 - Características da lâmina de Microarray – Agilent

SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K Microarray Kit

Feature	Specification
Agilent Product Number	G4851A
Design ID	028004
Format	8 x 60K
Arrays/Slide	8
Slides/Kit	3
Biological Features	Target 27,958 Entrez Gene RNAs 7,419 lincRNAs
Replicates of Biological Probes	999 x 10
Positive Controls	96 x 10 ERCC control probes 10 x 32 E1A spike-in control probes
Gene List Annotations Design Files Probe Sequences	Visit Agilent's eArray application
Composition	Design based on <ul style="list-style-type: none"> • RefSeq Build 36.3 • Ensemble Release 52 • Unigene Build 216 • GenBank (April 2009) • Plus: novel content for lincRNAs (long intergenic noncoding RNAs)
Manufacturing	Agilent 60-mer SurePrint technology

Anexo 2 - Figuras de ordenação dos casos do TMA

mm		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
		0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12.0	13.2	14.4	15.6	16.8	18.0	mm
0	0	Placenta	A-711497 D	A-711666 A	A-711672	A-714497 A1	A-714957 A2	A-714958 A2	A-715012 E	A-715145 A1	A-715149 A2	A-713055 A2	A-715682 A	A-725260 F	A-712204 B1	A-712351	A-712571 C	0
1	1.2	A-712598 K	A-712973 A1	A-710325 A	A-710672 A	A-710917	A-721935 J	A-722162 A	A-718933 J2	A-718982 D3	A-718983 H1	A-718985 D2	A-719676 B	A-720042 A5	A-720543 H	836025 AM	A-713295 A6	1.2
2	2.4	A-713642 A1	A-713923 B2	A-714309 A2	A-721185 A	A-721239 C	A-721251 Q	A-721529 A2	A-721905 I	822546 B1	815961 C	814639 D3	813142 1A	834042 AF	812138 A1	A-807243 F2	A-708714 E	2.4
3	3.6	A-710040 C	A-712249 A2	835656 AJ	A-806657 A2	A-805971 I	A-805191 A1	A-804516 A1	A-803773 D3	A-803772 D2	A-802788 C	A-802746 B	A-802217 AC	902097 AC	813142 5	A-805191 A3	834042 AG	3.6
4	4.8	BA5-4976 A	BA5-4910 A1	BA5-4021 F	BA4-2218 A	BA7-5466 A	A-713216 A	A-713640 A1	A-716118 A1	A-717396 A	A-718957 J	A-719373 A	A-711493 A	A-726375 B5	A-800677 A7	A-800695 E4	A-804516 A2	4.8
5	6.0	A-726524 A	A-726499	A-715149 A2	A-715682 A	A-715856 A	A-716317 A	A-716586 A2	A-717155 B3	A-717743	A-705998	A-707115 A	A-707083 I	A-707059 A	A-706602 B	A-706597 A1	A-718933 J2	6.0
6	7.2	A-718682 A	A-718335 C	A-718082 A2	A-726297 A1	A-725829 A	A-707311 G	A-707313 A1	A-707886 A	A-708171 A2	A-708578	A-709247	A-709370 A	812832 A3	A-725532 B2	A-725251 G	A-724784 A	7.2
7	8.4	A-724436 A	A-723664 H1	A-723367	A-723208 O	A-723102	A-722716 A	A-722673 B	A-707775									8.4
8	9.6	Fígado	Próstata N	intestino	Melanoma	Linfonodo N	Músculo Esqueletico	Pele	Mama N									9.6
9	10.8																	10.8
10	12.0	Placenta	A-711497 D	A-711666 A	A-711672	A-714497 A1	A-714957 A2	A-714958 A2	A-715012 E	A-715145 A1	A-715149 A2	A-713055 A2	A-715682 A	A-725260 F	A-712204 B1	A-712351	A-712571 C	12.0
11	13.2	A-712598 K	A-712973 A1	A-710325 A	A-710672 A	A-710917	A-721935 J	A-722162 A	A-718933 J2	A-718982 D3	A-718983 H1	A-718985 D2	A-719676 B	A-720042 A5	A-720543 H	836025 AM	A-713295 A6	13.2
12	14.4	A-713642 A1	A-713923 B2	A-714309 A2	A-721185 A	A-721239 C	A-721251 Q	A-721529 A2	A-721905 I	822546 B1	815961 C	814639 D3	813142 1A	834042 AF	812138 A1	A-807243 F2	A-708714 E	14.4
13	15.6	A-710040 C	A-712249 A2	835656 AJ	A-806657 A2	A-805971 I	A-805191 A1	A-804516 A1	A-803773 D3	A-803772 D2	A-802788 C	A-802746 B	A-802217 AC	902097 AC	813142 5	A-805191 A3	834042 AG	15.6
14	16.8	BA5-4976 A	BA5-4910 A1	BA5-4021 F	BA4-2218 A	BA7-5466 A	A-713216 A	A-713640 A1	A-716118 A1	A-717396 A	A-718957 J	A-719373 A	A-711493 A	A-726375 B5	A-800677 A7	A-800695 E4	A-804516 A2	16.8
15	18.0	A-726524 A	A-726499	A-715149 A2	A-715682 A	A-715856 A	A-716317 A	A-716586 A2	A-717155 B3	A-717743	A-705998	A-707115 A	A-707083 I	A-707059 A	A-706602 B	A-706597 A1	A-718933 J2	18.0
16	19.2	A-718682 A	A-718335 C	A-718082 A2	A-726297 A1	A-725829 A	A-707311 G	A-707313 A1	A-707886 A	A-708171 A2	A-708578	A-709247	A-709370 A	812832 A3	A-725532 B2	A-725251 G	A-724784 A	19.2
17	20.4	A-724436 A	A-723664 H1	A-723367	A-723208 O	A-723102	A-722716 A	A-722673 B	A-707775									20.4
18	21.6	Fígado	Próstata N	intestino	Melanoma	Linfonodo N	Músculo Esqueletico	Pele	Mama N									21.6
mm	22.8																	22.8
mm		0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12.0	13.2	14.4	15.6	16.8	18.0	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm

Legenda: Figura explicativa com ordenação dos casos na lâmina de TMA

Anexo 3 - Sistema de graduação de Nottingham

Característica	Escore
Formação de túbulos	
Presente na maioria do tumor (> 75%)	1
Moderada: 10 a 75% do tumor	2
Mínima: < 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleos pequenos e regulares	1
Moderada hipertrofia e irregularidade	2
Acentuada variação de tamanho, nucléolos, cromatina grosseira	3
Contagem mitótica*	
Até 12 mitoses por 10 CGA	1
Entre 13 e 24 mitoses por 10 CGA	2
Mais que 24 mitoses por 10 CGA	3
Graduação final	Soma dos escores
Grau I	3 – 5
Grau II	6 – 7
Grau III	8 – 9

* Valores ajustados para o campo microscópico utilizado neste estudo

CGA: campo de grande aumento

Fonte: Adaptado de ELSTON e ELLIS (1991)

Anexo 4 – Estadiamento anatomopatológico

pT – Tumor primário	
pTx	Impossibilidade de avaliação do tamanho do tumor primário*
pT0	Sem evidência de tumor primário
pTis	Carcinoma <i>in situ</i> : carcinoma ductal <i>in situ</i> , carcinoma lobular <i>in situ</i> ou doença de Paget** da papila sem tumor subjacente
pT1	Tumor ≤ 2 cm em sua maior dimensão
pT1mic	Microinvasão ≤ 0.1 cm em sua maior dimensão***
pT1a	Tumor > 0.1 e ≤ 0.5 cm ou menos em sua maior dimensão
pT1b	Tumor > 0.5 cm e ≤ 1 cm em sua maior dimensão
pT1c	Tumor > 1 cm e ≤ 2 cm em sua maior dimensão
pT2	Tumor > 2.0 cm ≤ 5 cm em sua maior dimensão
pT3	Tumor > 5.0 cm em sua maior dimensão
pT4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede do tórax ou pele [^]
pT4a	Extensão à parede do tórax, excluindo-se o músculo peitoral ^{^^}
pT4b	Edema (incluindo <i>peau d'orange</i>) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites contíguos na mesma mama
pT4c	Soma de pT4a e pT4b
pT4d	Carcinoma inflamatório ^{^^^}
pN – Linfonodos regionais[#]	
pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex: remoção anterior ou não ressecados)
pN0	Ausência de metástases histológicas; pesquisa de células tumorais isoladas (ITC ^{##}) não realizada
pN0(i-)	Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC negativa por técnicas histológicas – hematoxilina/eosina e imunoistoquímica.
pN0(i+)	Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC positiva por técnicas histológicas – hematoxilina/eosina e imunoistoquímica; grupo de ITC $\leq 0,2$ mm
pN0(mol-)	Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC negativa por técnicas moleculares (RT-PCR)
pN0(mol+)	Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC positiva por técnicas moleculares
pN1	Metástases para 1 a 3 linfonodos (LN) axilares ou mamários internos com doença microscópica detectada através de dissecação de linfonodos sentinelas (DLS), mas clinicamente inaparente ^{###}
pN1mi	Micrometástases ^{####} $> 0,2$ mm e ≤ 2 mm
pN1a	Metástases para 1 a 3 LN axilares (pelo menos um grupo de células tumorais > 2.0 mm)
pN1b	Metástases em LN mamários internos detectados por DLS, mas clinicamente inaparentes
pN1c	Metástases para 1 a 3 LN axilares e mamários internos com doença microscópica detectada por DLS mas clinicamente inaparente. Se associados a mais de 3 LN axilares positivos, os LN mamários internos são classificados como pN3b para refletir a carga tumoral aumentada
pN2	Metástases em 4 a 9 LN axilares; ou LN mamários internos clinicamente aparentes na ausência de metástases em LN axilares
pN2a	Metástases para 4 a 9 LN axilares (pelo menos um grupo de células tumorais > 2.0 mm)
pN2b	Metástases para LN mamários internos clinicamente aparentes na ausência de metástases para LN axilares
pN3	Metástases 10 ou mais LN axilares, ou em LN infraclaviculares, ou em LN mamários internos ipsilaterais clinicamente aparentes na presença de 1 ou mais LN axilares positivos; ou em mais de 3 LN axilares com micrometástases clinicamente inaparentes em LN mamários internos ou LN supraclaviculares ipsilaterais
pN3a	Metástases em 10 ou mais LN axilares (pelo menos um grupo de células tumorais > 2.0 mm); ou metástases para LN infraclaviculares
pN3b	Metástases em LN mamários internos clinicamente aparentes na presença de 1 ou mais LN axilares positivos; ou em mais de 3 LN axilares e LN mamários internos com doença microscópica detectada por DLS mas clinicamente inaparente
pN3c	Metástases em LN supraclaviculares ipsilaterais
pM – Metástases à distância	
pMx	Não avaliada
pM0	Ausência de metástases
pM1	Metástases à distância, incluindo metástases em LN supraclaviculares homolaterais

OBSERVAÇÕES:

* Se houver tumor presente na margem de ressecção macroscópica, o caso é codificado como pTx por impossibilidade de acesso ao tamanho completo do tumor.

** Doença de Paget associada a tumor subjacente é classificada de acordo com o tamanho do tumor

***Microinvasão é a extensão de células neoplásicas além da membrana basal aos tecidos adjacentes, com focos não maiores que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há múltiplos focos de microinvasão, o tamanho do maior foco é utilizado para classificar a microinvasão (não deve se usada a soma de todos os focos individuais). A presença de múltiplos focos deve ser quantificada e notificada, bem como a presença de múltiplos focos maiores de carcinomas invasivos.

^ Invasão dérmica isolada (sem ulceração, nódulos satélites ou carcinoma inflamatório) não altera a categoria T. Os casos são classificados como T1, T2 ou T3, dependendo de seu tamanho.

^^ Tumor no músculo peitoral deve ser medido em conjunto com o tumor mamário contíguo para a determinação do tamanho tumoral e a categoria T final.

^^^ Carcinoma inflamatório da mama é uma entidade clínico-patológica caracterizada por eritema difuso e edema envolvendo a maior parte da pele da mama, freqüentemente sem massa palpável subjacente. A apresentação clínica é devida a êmbolos tumorais em linfáticos, apesar deles poderem não ser observados numa biópsia da pele. O diagnóstico é estabelecido pela combinação dos achados clínicos com uma biópsia evidenciando o carcinoma no parênquima mamário ou nos linfáticos dérmicos. A presença de êmbolos linfáticos dérmicos sem o quadro clínico típico não é diagnóstica de carcinoma inflamatório. Num caso de carcinoma inflamatório clínico (cT4d) se a biópsia de pele da mama for negativa e não houver carcinoma localizado subjacente mensurável, a categorização patológica deve ser pTx. Retração da pele ou do mamilo, bem como outras alterações cutâneas, exceto aquelas dos estádios T4b e T4d, podem ocorrer em tumores T1, T2 ou T3 sem afetar sua classificação.

Há situações onde o patologista não pode fazer a avaliação completa dos linfonodos (LN) em decorrência do procedimento cirúrgico realizado para a sua abordagem, ou porque os dados de procedimentos prévios não estão disponíveis ou estão incompletos. Nessas situações, deve-se classificar o estadiamento nodal como "pNx" ao invés do número do TNM.

A classificação é baseada na dissecação dos LN axilares com ou sem a dissecação dos LN sentinela. Quando a classificação for baseada apenas na dissecação dos linfonodos sentinela sem dissecação axilar subsequente, deve-se acrescentar a abreviatura (sn) à classificação, por exemplo, pN0(i+)(sn).

Células tumorais isoladas (ITC) são definidas como células únicas isoladas ou em pequenos grupos não maiores que 0,2 mm. Elas podem ser detectadas através de exame histológico de rotina, por imunoistoquímica ou métodos moleculares (RT-PCR). As ITC geralmente não mostram evidências de atividade maligna (ex: proliferação ou reação estromal).

Doença clinicamente aparente é definida pela detecção de LN através de estudos de imagem (excluindo linfocintilografia) ou através de exame clínico.

Micrometástases podem mostrar evidência histológica de atividade maligna (ex: proliferação ou reação estromal).

Anexo 5 – Carta de aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq)

**Hospital
A.C. Camargo**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 05 de Novembro de 2009.

**Ao
Dr. Mario Mourão Netto**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1294/09
“Influência do microambiente do tumor primário e do linfonodo comprometido por
tumor na expressão gênica do câncer 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 20/10/2009, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 08/09/2009, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Mastologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Gerente do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à
assistente do CEP dentro de 12 meses.**

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900 - CNPJ 60.961.968/0001-06
Tel/Fax (0XX11)2189.5020 – cep_hcancer@hcancer.org.br

1/1

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 1319/09

Título: INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE NO PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA

Pesquisador Responsável: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

Pesquisador Executante: Fabiana Baroni Alves Makdissi

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 06/11/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 27.09.13 - Solicitação de alteração do título da pesquisa para "Influência do microambiente no prognóstico do câncer de mama" + Relatório parcial do estudo**

CAPPesq, 06 de Novembro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Ademuyiwa FO, Thorat MA, Jain RK, Nakshatri H, Badve S. Expression of Forkhead box protein A1, a marker of luminal A type breast cancer, parallels low Oncotype DX 21-gene recurrence scores. *Mod Pathol*. 2010; 23:270-5.

Allen MD, Vaziri R, Green M, Chelala C, Brentnall AR, Dreger S, Vallath S, Nitch-Smith H, Hayward J, Carpenter R, Holliday DL, Walker RA, Hart IR, Jones JL. Clinical and functional significance of $\alpha 9 \beta 1$ integrin expression in breast cancer: a novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion. *J Pathol*. 2011; 223:646-58.

Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004; 6:17-32.

Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, McGuire WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 1992; 23:974-9.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray) *J Bras Patol Med Lab*. 2007; 43:55-60.

Angelucci C, Maulucci G, Lama G, Proietti G, Colabianchi A, Papi M, Maiorana A, De Spirito M, Micera A, Balzamino OB, Di Leone A, Masetti R, Sica G. Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLoS One*. 2012; 7:e50804.

Badve S, Turbin D, Thorat MA, Morimiya A, Nielsen TO, Perou CM, Dunn S, Huntsman DG, Nakshatri H. FOXA1 expression in breast cancer--correlation with luminal subtype A and survival. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 Pt 1:4415-21.

Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*. 2010; 29:1732-40.

Bedard PL, Piccart-Gebhart MJ. Current paradigms for the use of HER2-targeted therapy in early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2008; 8 Suppl 4:S157-65.

Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørli T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Russnes HG, Nesland JM, Tammi R, Auvinen P, Kosma VM, Ménard S, Børresen-Dale AL. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. 2008; 214:357-67.

Bianchini G, Qi Y, Alvarez RH, Iwamoto T, Coutant C, Ibrahim NK, Valero V, Cristofanilli M, Green MC, Radvanyi L, Hatzis C, Hortobagyi GN, Andre F, Gianni L, Symmans WF, Pusztai L. Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and -negative cancers. *J Clin Oncol*. 2010; 28:4316-23.

Camp JT, Elloumi F, Roman-Perez E, Rein J, Stewart DA, Harrell JC, Perou CM, Troester MA. Interactions with fibroblasts are distinct in Basal-like and luminal breast cancers. *Mol Cancer Res*. 2011; 9:3-13.

Casbas-Hernandez P, Fleming JM, Troester MA. Gene expression analysis of in vitro cocultures to study interactions between breast epithelium and stroma. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:520987.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:736-50.

Chiu WT, Lee HT, Huang FJ, Aldape KD, Yao J, Steeg PS, Chou CY, Lu Z, Xie K, Huang S. Caveolin-1 upregulation mediates suppression of primary breast tumor growth and brain metastases by stat3 inhibition. *Cancer Res.* 2011; 71:4932-43.

De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003; 200:429-47.

Dong-Le Bourhis X, Berthois Y, Millot G, Degeorges A, Sylvi M, Martin PM, Calvo F. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int J Cancer.* 1997; 71:42-8.

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 randomised trials. *Lancet.* 2005; 365:1687-717.

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

Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med.* 2008; 12:22-37.

Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355:560-9.

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, André S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med.* 2009; 15:68-74. Erratum in: *Nat Med.* 2009; 15:220.

Fenne IS, Helland T, Flågeng MH, Dankel SN, Mellgren G, Sagen JV. Downregulation of steroid receptor coactivator-2 modulates estrogen-responsive genes and stimulates proliferation of mcf-7 breast cancer cells. *PLoS One.* 2013; 8:70096.

Fiegler N, Textor S, Arnold A, Rölle A, Oehme I, Breuhahn K, Moldenhauer G, Witzens-Harig M, Cerwenka A. Downregulation of the activating NKp30 ligand B7-H6 by HDAC inhibitors impairs tumor cell recognition by NK cells. *Blood.* 2013; 122:684-93.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008; 14:518-27.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol.* 1988; 6:1076-87.

Fisher B, Wickerham DL, Brown A, Redmond CK. Breast cancer estrogen and progesterone receptor values: their distribution, degree of concordance, and relation to number of positive axillary nodes. *J Clin Oncol.* 1983; 1:349-58.

García-Fernández MO, Collado B, Bodega G, Cortés J, Ruíz-Villaespesa A, Carmena MJ, Prieto JC. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol Endocrinol.* 2005; 20:327-33.

Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, Jackisch C, Cameron D, Weber HA, Heinzmann D, Dal Lago L, McFadden E, Dowsett M, Untch M, Gianni L, Bell R, Köhne CH, Vindevoghel A, Andersson M, Brunt AM, Otero-Reyes D, Song S, Smith I, Leyland-Jones B, Baselga J; Herceptin Adjuvant (HERA Trial Study Team. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2013; 382:1021-8.

Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res.* 2005; 65:3772-80.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sve-Sderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1992; 10:1049-56.

Harburg GC, Hinck L. Navigating breast cancer: axon guidance molecules as breast cancer tumor suppressors and oncogenes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16:257-70.

Habashy HO, Powe DG, Glaab E, Ball G, Spiteri I, Krasnogor N, Garibaldi JM, Rakha EA, Green AR, Caldas C, Ellis IO. RERG (Ras-like, oestrogen-regulated, growth-inhibitor expression in breast cancer: a marker of ER-positive luminal-like subtype. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128:315-26.

Hoadley KA, Weigman VJ, Fan C, Sawyer LR, He X, Troester MA, Sartor CI, Rieger-House T, Bernard PS, Carey LA, Perou CM. EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. *BMC Genomics*. 2007; 8:258.

Holliday DL, Hughes S, Shaw JA, Walker RA, Jones JL. Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res*. 2007; 9:R67.

Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001; 81:1331-8.

Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006; 7:96.

Huang H, Wang X, Zhang Y, Zheng X, Wei H, Sun R. Up-regulation of NKG2F receptor, a functionally unknown killer receptor, of human natural killer cells by interleukin-2 and interleukin-15. *Oncol Rep*. 2010; 24:1043-8.

Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1168-76.

Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ, Mailloux CM, Sufit AJ, Hutton SM, Amadi-Myers A, Bennett DC, Wallace MR, McCormack WT, Kemp EH, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Picardo M, Leone G, Taïeb A, Jouary T, Ezzedine K, van Geel N, Lambert J, Overbeck A, Spritz RA. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med*. 2010; 362:1686-97.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:392-401.

Kao KJ, Chang KM, Hsu HC, Huang AT. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. *BMC Cancer*. 2011; 11:143.

Karn T, Ruckhäberle E, Hanker L, Müller V, Schmidt M, Solbach C, Gätje R, Gehrmann M, Holtrich U, Kaufmann M, Rody A. Gene expression profiling of luminal B breast cancers reveals NHERF1 as a new marker of endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 130:409-20.

Kominami R. Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012; 88:72-87.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4:844-7.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:12072-7.

Kumagai K, Nimura Y, Mizota A, Miyahara N, Aoki M, Furusawa Y, Takiguchi M, Yamamoto S, Seki N. Arpc1b gene is a candidate prediction marker for choroidal malignant melanomas sensitive to radiotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:2300-4.

Kunz-Schughart LA, Heyder P, Schroeder J, Knuechel R. A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. *Exp Cell Res.* 2001; 266:74-86.

Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:4966-71.

Kurt RA, Urba WJ, Smith JW, Schoof DD. Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signaling molecules. *Int J Cancer*. 1998; 78:16-20.

Lefebvre MF, Guillot C, Crepin M, Saez S. Influence of tumor derived fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 33:189-97.

Liu ET. Stromal effects in breast cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357:2537-8.

Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B, Lallemant F, Conus NM, Piccart MJ, Speed TP, McArthur GA. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics*. 2009; 2:37.

Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:R7.

Ma Y, Taylor SS. A molecular switch for targeting between endoplasmic reticulum (ER and mitochondria: conversion of a mitochondria-targeting element into an ER-targeting signal in DAKAP1. *J Biol Chem*. 2008; 283:11743-51.

Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, Natrajan R, A'Hern R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J Natl Cancer Inst*. 2011; 103:662-73.

Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011; 71:5678-87.

Martin DN, Boersma BJ, Yi M, Reimers M, Howe TM, Yfantis HG, Tsai YC, Williams EH, Lee DH, Stephens RM, Weissman AM, Ambis S. Differences in the tumor microenvironment between African-American and European-American breast cancer patients. *PLoS One.* 2009; 4:e4531.

Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, Wang C, Pavlides S, Martinez-Cantarin MP, Capozza F, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Caro J, Lisanti MP, Sotgia F. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle.* 2010; 9:3515-33.

Mercier I, Casimiro MC, Wang C, Rosenberg AL, Quong J, Minkeu A, Allen KG, Danilo C, Sotgia F, Bonuccelli G, Jasmin JF, Xu H, Bosco E, Aronow B, Witkiewicz A, Pestell RG, Knudsen ES, Lisanti MP. Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation and RB tumor suppressor functional inactivation: Implications for the response to hormonal therapy. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7:1212-25.

Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer.* 2004; 45 Suppl 2:S163-75.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de câncer. Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Molli PR, Li DQ, Bagheri-Yarmand R, Pakala SB, Katayama H, Sen S, Iyer J, Chernoff J, Tsai MY, Nair SS, Kumar R. Arpc1b, a centrosomal protein, is both an activator and substrate of Aurora A. *J Cell Biol.* 2010; 190:101-14.

Murphy LC, Leygue E, Niu Y, Snell L, Ho SM, Watson PH. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2002; 87:1411-6.

O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, Dewar R, Rocha RM, Brentani RR, Resnick MB, Neilson EG, Zeisberg M, Kalluri R. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:16002-7.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005; 121:335-48.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351:2817-26.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009; 27:1160-7.

Pavlidis S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. 2009; 8:3984-4001.

Perenkov AD, Novikov DV, Sakharov NA, Aliasova AV, Utkin OV, Baryshnikov Alu, Novikov VV. [Heterogeneous expression of CD38 gene in tumor tissue in patients with colorectal cancer]. *Mol Biol*. 2012; 46:786-91.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu X, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-52.

Planche A, Bacac M, Provero P, Fusco C, Delorenzi M, Stehle JC, Stamenkovic I. Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer. *PLoS One*. 2011; 6:18640.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011; 5:5-23.

Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AH, Pinder SE, Ellis IO. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol*. 2005; 18:26-35.

Rauhala HE, Teppo S, Niemelä S, Kallioniemi A. Silencing of the ARP2/3 complex disturbs pancreatic cancer cell migration. *Anticancer Res*. 2013; 33:45-52.

Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011; 378:1812-23.

Romero-Camarero I, Jiang X, Natkunam Y, Lu X, Vicente-Dueñas C, Gonzalez-Herrero I, Flores T, Garcia JL, McNamara G, Kunder C, Zhao S, Segura V, Fontan L, Martínez-Climent JA, García-Criado FJ, Theis JD, Dogan A, Campos-Sánchez E, Green MR, Alizadeh AA, Cobaleda C, Sánchez-García I, Lossos IS. Germinal centre protein HGAL promotes lymphoid hyperplasia and amyloidosis via BCR-mediated Syk activation. *Nat Commun*. 2013;4:1338.

Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma*. 2013; 54:2351-64.

Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, Torres CH, Katayama ML, Roela RA, Lyra EC, Soares FA, Folgueira MA, Góes JC, Brentani MM. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *Int J Cancer*. 2009; 125:2767-77.

Sadlonova A, Novak Z, Johnson MR, Bowe DB, Gault SR, Page GP, Thottassery JV, Welch DR, Frost AR. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. *Breast Cancer Res*. 2005; 7:R46-59.

Santos RP, Benvenuti TT, Honda ST, Del Valle PR, Katayama ML, Brentani HP, Carraro DM, Rozenchan PB, Brentani MM, de Lyra EC, Torres CH, Salzgeber MB, Kaiano JH, Góes JC, Folgueira MA. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression. *Tumour Biol*. 2011; 32:145-57.

Sauter G, Mirlacher M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. *J Clin Pathol*. 2002; 55:575-6.

Sellick GS, Wade R, Richards S, Oscier DG, Catovsky D, Houlston RS. Scan of 977 nonsynonymous SNPs in CLL4 trial patients for the identification of genetic variants influencing prognosis. *Blood*. 2008; 111:1625-33.

Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res*. 2001; 61:1320-6.

Simpkins SA, Hanby AM, Holliday DL, Speirs V. Clinical and functional significance of loss of caveolin-1 expression in breast cancer-associated fibroblasts. *J Pathol*. 2012; 227:490-8.

Singer CF, Gschwantler-Kaulich D, Fink-Retter A, Haas C, Hudelist G, Czerwenka K, Kubista E. Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 110:273-81.

Sloan EK, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A, Restall C, Henderson MA, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Gago FE, Anderson RL. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol*. 2009; 174:2035-43.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10869-74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:8418-23.

Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5:1640-6.

Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, Kalos M, Vondeheide RH, Albelda SM, June CH, Zhang PJ. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 133:799-804.

Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol*. 2001; 11:97-104.

Toullec A, Gerald D, Despouy G, Bourachot B, Cardon M, Lefort S, Richardson M, Rigai G, Parrini MC, Lucchesi C, Bellanger D, Stern MH, Dubois T, Sastre-Garau X, Delattre O, Vincent-Salomon A, Mechta-Grigoriou F. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med*. 2010; 2:211-30.

Triulzi T, Casalini P, Sandri M, Ratti M, Carcangiu ML, Colombo MP, Balsari A, Ménard S, Orlandi R, Tagliabue E. Neoplastic and stromal cells contribute to an extracellular matrix gene expression profile defining a breast cancer subtype likely to progress. *PLoS One*. 2013; 8:56761.

Tsygankov AY. TULA-family proteins: a new class of cellular regulators. *J Cell Physiol*. 2013; 228:43-9.

Vainio P, Lehtinen L, Mirtti T, Hilvo M, Seppänen-Laakso T, Virtanen J, Sankila A, Nordling S, Lundin J, Rannikko A, Orešič M, Kallioniemi O, Iljin K. Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. *Oncotarget*. 2011; 2:1176-90.

Wallace JA, Li F, Leone G, Ostrowski MC. Pten in the breast tumor microenvironment: modeling tumor-stroma coevolution. *Cancer Res*. 2011; 71:1203-7.

Wang C, Zhou L, Li S, Wei J, Wang W, Zhou T, Liao S, Weng D, Deng D, Weng Y, Wang S, Ma D. C4orf7 contributes to ovarian cancer metastasis by promoting cancer cell migration and invasion. *Oncol Rep*. 2010; 24:933-9.

Wang TN, Albo D, Tiszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery*. 2002; 132:220-225.

Witkiewicz AK, Dasgupta A, Nguyen KH, Liu C, Kovatich AJ, Schwartz GF, Pestell RG, Sotgia F, Rui H, Lisanti MP. Stromal caveolin-1 levels predict early DCIS progression to invasive breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2009; 8:1071-9.

West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011; 13:R126.

Wiencke JK, Accomando WP, Zheng S, Patoka J, Dou X, Phillips JJ, Hsuang G, Christensen BC, Houseman EA, Koestler DC, Bracci P, Wiemels JL, Wrensch M, Nelson HH, Kelsey KT. Epigenetic biomarkers of T-cells in human glioma. *Epigenetics*. 2012; 7:1391-402.

Witkiewicz AK, Dasgupta A, Nguyen KH, Liu C, Kovatich AJ, Schwartz GF, Pestell RG, Sotgia F, Rui H, Lisanti MP. Stromal caveolin-1 levels predict early DCIS progression to invasive breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2009; 8:1071-9.

Wu M, Han L, Shi Y, Xu G, Wei J, You L, Chen Y, Zhu T, Li Q, Li S, Meng L, Lu Y, Zhou J, Wang S, Ma D. Development and characterization of a novel method for the analysis of gene expression patterns in lymphatic endothelial cells derived from primary breast tissues. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136:863-72.

Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer*. 2012; 19:170-6.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Relação das amostras do TMA

Caso	Idade (anos)	Data da operação	Data da última consulta	Status	Óbito	Óbito pela doença	Seguimento (meses)	Tipo histológico	Dimensão do tumor (cm)	TNM- pT	TNM -pN	TNM Estadio Patológico
1	43	07/12/07	02/08/13	SED	não	...	69	CDI	1,5	1	0	1
2	31	07/11/07	26/08/13	SED	não	...	71	CDI	3,8	2	0	2
3	90	17/07/07	02/09/08	SED	não	...	14	CDI	2,0	1	0	1
4	35	07/12/07	08/05/08	SED	não	...	5	CDI	2,5	2	0	2
5	54	19/07/07	25/03/09	SED	não	...	21	CDI	1,5	1	0	1
6	55	21/08/07	20/08/13	SED	não	...	73	CDI	0,5	1	0	1
7	34	18/07/07	03/07/13	SED	não	...	73	CDI	0,9	1	1	2
8	78	15/08/07	30/10/07	SED	não	...	3	CDI	2,0	1	0	1
9	56	14/08/07	26/08/13	SED	não	...	73	CDI	0,6	1	0	1
10	54	25/07/07	12/03/08	SED	não	...	8	CDI	3,2	2	1	2
11	58	14/08/07	07/06/11	SED	não	...	46	CDI	1,2	1	0	1
12	43	15/08/07	17/06/13	SED	não	...	71	CDI	2,2	2	0	2
13	50	12/08/07	23/07/12	SED	não	...	60	CDI	0,5	1	0	1
14	51	27/11/08	26/04/13	SED	não	...	54	CDI	0,8	1	0	1
15	65	07/05/07	12/08/13	SED	não	...	76	CDI	1,5	1	0	1
16	46	21/05/07	05/04/13	SED	não	...	72	CDI	1,7	1	1	2
17	43	28/06/07	01/04/13	SED	não	...	70	CDI	3,5	2	0	2
18	78	27/09/07	26/08/13	SED	não	...	72	CDI	3,1	2	1	2
19	42	20/07/07	11/09/09	SED	não	...	26	CDI	1,3	1	0	1
20	55	26/07/07	23/05/12	SED	não	...	59	CDI	2,5	2	0	2
21	44	28/09/07	02/08/13	SED	não	...	71	CDI	1,5	1	0	1
22	44	28/09/07	04/09/13	SED	não	...	72	CDI	2,4	2	0	2
23	48	28/09/07	21/08/13	SED	não	...	72	CDI	1,7	1	1	2
24	59	10/10/07	20/08/13	SED	não	...	71	CDI	1,5	1	0	1
25	53	10/05/07	06/08/13	SED	não	...	76	CDI	1,5	1	0	1
26	51	16/10/07	27/08/13	SED	não	...	71	CDI	3,0	2	1	2
27	59	11/01/07	09/05/13	SED	não	...	77	CDI	2,5	2	1	2
28	55	30/10/07	23/08/13	SED	não	...	71	CDI	1,0	1	1	2
29	74	07/05/08	14/11/11	SED	não	...	43	CDI	1,0	1	0	1
30	47	11/11/08	18/09/13	SED	não	...	59	CDI	1,2	1	0	1
31	69	16/05/08	04/09/13	SED	não	...	65	CDI	0,9	1	0	1

Caso	Idade (anos)	Data da operação	Data da última consulta	Status	Óbito	Óbito pela doença	Seguimento (meses)	Tipo histológico	Dimensão do tumor (cm)	TNM- pT	TNM -pN	TNM Estadio Patológico
32	44	31/03/08	29/10/12	OBI	sim	sim	56	CDI	9,0	3	3	3
33	62	31/07/07	14/05/13	SED	não	...	70	CDI	0,7	1	0	1
34	54	08/02/07	26/06/13	SED	não	...	78	CDI	3,2	2	0	2
35	88	08/07/07	18/07/10	OBI	sim	não	37	CDI	2,4	2	0	2
36	54	24/10/07	05/08/13	SED	não	...	70	CDI	7,0	3	2	3
37	69	15/10/07	22/08/13	SED	não	...	71	CDI	3,8	2	1	2
38	70	23/10/07	30/09/13	SED	não	...	72	CDI	2,0	1	2	3
39	74	12/06/07	30/09/12	MET	não	...	65	CDI	10,0	3	1	3
40	83	31/01/08	09/02/09	SED	não	...	13	CDI	4,0	2	1	2
41	40	25/11/08	24/07/13	SED	não	...	57	CDI	1,0	1	0	1
42	52	07/03/08	20/05/13	SED	não	...	63	CDI	2,0	1	0	1
43	64	13/03/08	19/09/13	SED	não	...	67	CDI	0,7	1	0	1
44	46	14/02/08	01/09/09	SED	não	...	19	CDI	2,3	2	1	2
45	68	31/01/08	20/08/13	SED	não	...	68	CDI	1,5	1	1	2
46	61	26/06/07	08/02/13	SED	não	...	68	CDI	5,0	2	1	2
47	69	24/01/08	30/01/12	SED	não	...	49	CDI	0,8	1	0	1
48	44	17/07/07	20/08/13	SED	não	...	74	CDI	1,8	1	1	2
49	54	11/01/08	11/06/08	SED	não	...	5	CDI	0,6	1	0	1
50	53	28/09/07	15/08/13	SED	não	...	72	CDI	1,7	1	0	1
51	79	07/11/07	05/06/13	SED	não	...	68	CDI	1,0	1	1	2
52	79	09/11/07	29/08/13	SED	não	...	71	CDI	1,2	1	0	1
53	63	01/11/08	12/06/13	SED	não	...	56	CDI	2,0	1	1	2
54	75	26/07/07	18/10/10	MET	não	...	39	CDI	2,8	2	0	2
55	67	31/07/07	02/09/13	SED	não	...	74	CDI	1,5	1	0	1
56	48	09/03/04	19/12/12	SED	não	...	107	CDI	1,4	1	0	1
57	63	23/05/05	26/09/13	SED	não	...	102	CDI	2,2	2	2	3
58	55	19/05/05	02/09/13	SED	não	...	101	CDI	2,5	2	0	2
59	64	14/05/01	26/11/12	SED	não	...	140	CDI	1,0	1	0	1
60	56	17/05/07	27/11/12	SED	não	...	67	CDI	1,5	1	0	1
61	76	22/05/07	14/02/11	SED	não	...	45	CDI	1,8	1	0	1
62	57	23/05/07	30/07/13	SED	não	...	75	CDI	1,0	1	0	1
63	51	23/08/07	08/01/13	SED	não	...	66	CDI	2,3	2	0	2
64	60	30/08/07	08/04/11	SED	não	...	44	CDI	1,0	1	0	1

Caso	Idade (anos)	Data da operação	Data da última consulta	Status	Óbito	Óbito pela doença	Seguimento (meses)	Tipo histológico	Dimensão do tumor (cm)	TNM- pT	TNM -pN	TNM Estadio Patológico
65	39	09/06/07	06/08/13	SED	não	...	75	CDI	2,5	2	2	3
66	50	14/09/07	27/03/13	SED	não	...	67	CDI			0	
67	38	07/05/05	04/09/13	MET	não	...	101	CDI	3,5	2	0	2
68	40	20/12/07	30/01/12	SED	não	...	50	CDI	1,0	1	0	1
69	58	22/05/07	15/04/13	SED	não	...	72	CDI	1,5	1	0	1
70	70	06/11/07	04/11/10	OBI	sim	não	36	CDI	1,3	1	0	1
71	60	31/05/07	24/05/13	SED	não	...	73	CDI	2,5	2	0	2
72	85	06/06/07	06/11/07	OBI	sim	sim	5	CDI	2,0	1	1	2
73	52	25/05/07	21/08/13	SED	não	...	76	CDI	2,0	1	0	1
74	55	19/06/07	22/08/13	SED	não	...	75	CDI	2,0	1	0	1
75	59	17/07/07	16/04/12	SED	não	...	58	CDI	1,2	1	0	1
76	57	19/09/07	07/02/13	SED	não	...	66	CDI	1,2	1	0	1
77	46	20/09/07	06/09/13	SED	não	...	73	CDI	2,2	2	0	2
78	56	13/11/07	30/09/13	SED	não	...	72	CDI	1,0	1	0	1
79	77	12/11/07	27/06/08	SED	não	...	8	CDI	0,8	1	0	1
80	54	27/10/07	29/08/13	SED	não	...	71	CDI	2,0	1	1	2
81	67	13/12/07	02/07/08	SED	não	...	7	CDI	1,1	1	0	1
82	37	12/07/07	04/08/08	SED	não	...	13	CDI	2,0	1	1	2
83	62	14/11/07	03/12/12	SED	não	...	62	CDI	1,0	1	0	1
84	40	11/09/07	10/09/13	SED	não	...	73	CDI	0,7	1	0	1
85	59	16/10/07	02/08/13	SED	não	...	71	CDI	0,7	1	0	1
86	62	23/11/07	14/06/13	SED	não	...	68	CDI	1,2	1	0	1
87	50	11/08/07	09/01/08	SED	não	...	5	CDI	1,6	1	1	2
88	48	30/11/07	28/05/12	SED	não	...	55	CDI	1,5	1	0	1
89	44	28/11/07	17/09/13	MET	não	...	71	CDI	3,0	2	0	2

Cont/ Apêndice 1

Caso	Grau nuclear	Grau histológico	Invasão vâsculo-sanguinea	Invasão vâsculo-linfática	Invasão perineural	Nº de linfonodos comprometidos	Nº de linfonodos ressecados	IIQ-ER	IIQ-PR	IIQ-HER	QT	RXT	Hormonioterapia
1	1	1	não	não	não	0	0	10	100	0	não	sim	sim
2	3	3	não	não	não	0	4	80	80	0	sim	não	não
3	3	3	não	sim	sim	0	1	0	0	0	não	não	não
4	2	1	não	não	não	0	2	40	80	0	sim	não	sim
5	3	3	não	não	não	0	2	70	80	2	sim	sim	sim
6	2	2	não	não	não	0	1	90	0	0	não	sim	sim
7	3	3	não	não	não	1	35	80	30	0	sim	sim	sim
8	3	2	não	não	não	0	1	100	30	0	não	sim	sim
9	2	1	não	não	não	0	1	80	80	0	não	sim	sim
10	3	3	não	sim	não	1	23	0	15	0	não	sim	sim
11	3	2	não	não	não	0	2	100	0	0	sim	sim	sim
12	3	2	não	não	não	0	1	90	80	0	sim	sim	sim
13	3	2	não	não	não	0	1	90	100	1	não	sim	sim
14	2	2	não	sim	sim	0	1	80	100	0	não	não	sim
15	2	1	não	não	não	0	0	100	100	0	não	não	
16	3	2	não	não	não	1	17	30	90	0	sim	sim	sim
17	3	3	não	não	não	0	14	90	20	0	sim	não	sim
18	2	2	não	sim	não	2	20	80	80	2	sim	sim	sim
19	3	2	não	não	não	0	1	50	0	2	não	não	sim
20	2	1	não	não	não	0	1	5	5	0	sim	não	não
21	3	2	não	não	não	0	1	70	80	2	sim	não	sim
22	1	1	não	não	sim	0	3	40	80	1	sim	não	sim
23	3	3	não	não	não	2	4	60	30	1	sim	sim	sim
24	3	3	não	não	não	0	1	90	70	0	sim	sim	sim
25	3	2	não	sim	sim	0	2	80	40	1	sim	sim	sim
26	2	2	não	sim	sim	3	9	80	80	0	sim	sim	sim
27	3	3	não	não	não	1	23	90	20	1	sim	não	sim
28	2	1	não	sim	não	1	2	100	10	1	sim	sim	sim
29	2	1	não	não	não	0	22	90	90	0	não	não	sim
30	3	3	não	não	não	0	26	70	1	0	sim	sim	sim
31	1	1	não	não	não	0	2	70	40	0	não	sim	sim

Caso	Grau nuclear	Grau histológico	Invasão vásculo-sanguínea	Invasão vásculo-linfática	Invasão perineural	Nº de linfonodos comprometidos	Nº de linfonodos ressecados	IIQ-ER	IIQ-PR	IIQ-HER	QT	RXT	Hormonioterapia
32	3	2	não	sim	não	23	29	80	.	1	sim	sim	sim
33	1	1	não	não	não	0	1	0	2		não	sim	sim
34	2	2	não	não	não	0	20	80	20	0	sim	não	sim
35	3	3	não	não	não	0	11	100	60	2	não	não	sim
36	3	3	não	sim	sim	5	17	90	20	0	sim	sim	sim
37	3	3	sim	não	não	1	11	70	80	1	sim	sim	sim
38	3	2	não	sim	sim	4	12	100	40	0	sim	sim	sim
39	3	2	não	não	sim	1	23	95	0	0	não	sim	sim
40	3	2	não	não	não	1	23	100	80	0	não	não	sim
41	3	2	não	não	não	0	4	70	90	0	sim	sim	sim
42	2	1	não	não	não	0	1	70	40	0	não	sim	sim
43	1	1	não	não	não	0	1	100	10	1	não	sim	sim
44	3	3	não	não	não	1	35				sim	não	sim
45	1	1	não	não	não	1	12	80	80	0	sim	sim	sim
46	2	2	não	não	não	1	21	80	10	0	sim	sim	sim
47	2	1	não	não	não	0	2				não	sim	sim
48	3	2	não	sim	não	1	15				sim	não	sim
49	3	2	não	não	não	0	1	90	90	1	não	sim	sim
50	3	2	não	não	não	0	1	30	5	2	sim	sim	sim
51	2	1	não	não	não	1	3	100	70	0	não	sim	sim
52	2	1	não	não	não	0	18	80	80	1	não	sim	sim
53	2	2	não	não	não	1	19				sim	sim	sim
54	3	3	não	sim	não	0	1	90	0	0	não	sim	sim
55	2	1	não	não	não	0	2				sim	não	sim
56	2	2				0	3	95	100		sim	sim	sim
57	3	3	não	não	não	7	18	100	10	2	não	sim	sim
58	3	2	não	não	não	0	14	90	10	0	não	não	sim
59	1	1	não	sim	não	0	0	90	40	1	não	sim	sim
60	2	2	não	não	não	0	2	80		0	não	não	sim
61	2	1	não	não	não	0	13	90	90	0	não	não	sim
62	3	3	não	não	não	0	3	60	10	1	não	não	sim
63	3	3	não	não	não	0	2	70	50	0	sim	sim	sim
64	3	2	não	não	não	0	2	90	80	1	não	não	sim

Caso	Grau nuclear	Grau histológico	Invasão vásculo-sanguínea	Invasão vásculo-linfática	Invasão perineural	Nº de linfonodos comprometidos	Nº de linfonodos ressecados	IIQ-ER	IIQ-PR	IIQ-HER	QT	RXT	Hormonioterapia
65	3	2	não	não	não	7	15	90	100	0	sim	sim	
66	3	3	não	não	não	0	0	30	50	1	sim	sim	sim
67	2	2	não	não	não	0	19	90	70		sim	não	
68	3	2	não	não	não	0	1	90	90	0	sim	não	sim
69	3	3	não	não	não	0	1	50	0		sim	não	sim
70	1	1	não	não	não	0	14	95	95	0	não	não	
71	3	2	não	não	não	0	2	80	10	1	não	não	
72	3	3	não	não	não	1	1	50	0	0	não	não	
73	3	2	sim	não	não	0	2	80	30	2	sim	não	sim
74	2	2	não	não	não	0	2	100	0	2	sim	não	sim
75	2	2	não	não	não	0	1	90	80	1	sim	não	sim
76	2	2	não	não	não	0	1				não	sim	sim
77	3	3	não	não	não	0	2	30	30	2	sim	sim	sim
78	2	1	não	não	não	0	2	90	90		não	sim	sim
79	3	2	não	não	não	0	1	60	70	1	não	não	sim
80	3	2	não	não	sim	1	17	90	20	1	sim	não	sim
81	2	2	não	não	não	0	2	90	90	1	não	não	sim
82	3	2	não	sim	não	3	17	70	60	1	sim	não	
83	2	2	não	não	não	.	.	10	40	0	não	sim	sim
84	3	2	não	não	não	0	3	60	80	1	não	sim	sim
85	2	1	não	não	não	0	2	90	0	0	não	sim	sim
86	2	2	não	não	não	0	1	80	40	1	sim	sim	sim
87	3	2	não	sim	sim	1	21	60	90	1	sim	não	
88	3	2	não	não	não	0	21	90	15	0	sim	não	sim
89	2	2	não	não	não	10	21				sim	sim	sim

Cont/ Apêndice 1

Caso	Recidiva locorregional	Data da recidiva locorregional	Metástase	Data do diagnóstico da metástase	CAVstrI0	CAVstr %	HS CAVstr	S100str I0T	S100str %	HS do str	AMLstr INT
1	não		não		1	20	20	3	80	240	2
2	sim	04/11/10	sim		1	60	60	3	30	90	2
3	não		não		1	10	10	3	20	60	1
4	não		não		2	20	40	3	20	60	3
5	não		não		1	30	30	2	80	160	1
6	não		não		1	20	20	3	30	90	3
7	não		não		2	20	40	3	80	240	1
8	não		não		1	10	10	3	80	240	3
9	não		não		2	20	40	3	50	150	3
10	não		não		1	30	30	3	30	90	2
11	não		não		1	50	50	3	80	240	2
12	não		não		2	50	100	3	80	240	1
13	não		não		2	30	60	3	50	150	3
14	não		não		3	80	240	1	100	100	2
15	não		não		2	80	160	3	100	300	2
16	não		não		2	80	160	2	80	160	3
17	não		não		3	70	210	3	100	300	2
18	não		não		2	80	160	3	80	240	3
19	não		não		3	20	60	2	50	100	1
20	não		não		2	50	100	.	.	.	1
21	sim	21/01/10	não		1	50	50	3	80	240	3
22	não		não		2	60	120	3	50	150	3
23	não		não		2	60	120	2	50	100	2
24	não		não		3	90	270	1	50	50	3
25	não		não		2	30	60	3	30	90	1
26	não		não		1	20	20	3	50	150	3
27	não		não		1	20	20	3	100	300	3
28	não		não		1	10	10	3	80	240	3
29	não		não		1	20	20	3	50	150	2
30	não		não		2	30	60	2	80	160	2

Caso	Recidiva locorregional	Data da recidiva locorregional	Metástase	Data do diagnóstico da metástase	CAVstrl0	CAVstr %	HS CAVstr	S100str l0T	S100str %	HS do str	AMLstr INT
31	não		não		1	20	20	3	80	240	1
32	não		sim	15/12/10	1	10	10	3	20	60	2
33	não		não		1	10	10	3	30	90	3
34	não		não		1	30	30	3	60	180	1
35	não		não		1	10	10	3	50	150	2
36	não		não		2	60	120	2	30	60	2
37	não		não		1	10	10	2	10	20	3
38	não		não		2	20	40	3	30	90	2
39	não		sim	09/03/10	1	30	30	2	20	40	3
40	não		não		2	70	140	3	90	270	2
41	não		não		1	10	10	3	80	240	3
42	não		não		3	60	180	2	50	100	3
43	não		não		3	50	150	1	10	10	1
44	não		não		3	80	240	2	90	180	2
45	não		não		1	20	20	2	30	60	3
46	não		não		1	10	10	3	50	150	2
47	não		não		2	30	60	3	100	300	2
48	não		não		1	10	10	3	80	240	3
49	não		não		1	30	30	2	60	120	1
50	não		não		3	80	240	3	80	240	3
51	não		não		3	30	90	2	80	160	2
52	não		não		1	30	30	3	80	240	2
53	não		não		1	10	10	1	50	50	1
54	não		sim	01/07/10	0	0	0	3	30	90	2
55	não		não		1	20	20	2	10	20	1
56	não		não		1	10	10	3	40	120	2
57	não		não		1	20	20	2	70	140	2
58	não		não		2	30	60	3	40	120	1
59	não		não		2	10	20	0	0	0	3
60	não		não		1	10	10	2	20	40	3
61	não		não		2	50	100	3	80	240	3
62	não		não		2	10	20	3	50	150	0
63	sim	08/02/12	não		2	10	20	3	20	60	3
64	não		não		1	10	10	2	20	40	1

Caso	Recidiva locorregional	Data da recidiva locorregional	Metástase	Data do diagnóstico da metástase	CAVstrI0	CAVstr %	HS CAVstr	S100str I0T	S100str %	HS do str	AMLstr INT
65	não		não		2	10	20	3	90	270	3
66	não		não		3	80	240	2	90	180	1
67	não		sim	15/09/07	1	20	20	3	50	150	3
68	não		não		1	50	50	2	80	160	1
69	sim	01/06/10	não		2	20	40	2	60	120	3
70	não		não		1	30	30	2	30	60	1
71	não		não		2	40	80	2	10	20	1
72	não		sim	17/08/07	1	10	10	3	90	270	3
73	não		não		2	40	80	3	80	240	3
74	não		não		1	20	20	2	40	80	1
75	não		não		2	70	140	1	80	80	1
76	não		não		1	20	20	2	50	100	1
77	não		não		1	20	20	3	60	180	3
78	não		não		1	50	50	2	20	40	1
79	não		não		1	10	10	1	20	20	2
80	não		não		1	20	20	3	50	150	2
81	não		não		1	30	30	3	50	150	1
82	não		não		0	0	0	3	50	150	3
83	não		não		3	40	120	2	30	60	3
84	não		não		2	60	120	3	20	60	1
85	não		não		1	10	10	3	50	150	1
86	não		não		2	60	120	3	20	60	3
87	não		não		1	10	10	2	20	40	1
88	não		não		1	20	20	3	30	90	3
89	não		sim	15/05/13	3	30	90	3	70	210	2

Cont/ Apêndice 1

[illegible]

[illegible]