Regina Felipe Barboza

Estudo da expressão de NDRG1, Par-4, Osteonectina e
Pontina em lesões hiperplásicas da mama através da
técnica de imunohistoquímica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de doutor em ciências

Programa de Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barboza, Regina Felipe

Estudo da expressão de NDRG1, Par-4, osteonectina e pontina em lesões hiperplásicas da mama através da técnica de imunohistoquímica / Regina Felipe Barboza. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Doenças mamárias 3.Expressão gênica 4.*N-myc downstream regulated gene* 5.Osteonectina 6.*PAWR* 7.*Ruvbl1*

USP/FM/DBD-527/10

DEDICATÓRIA

À minha mãe, se viva, dedicaria este trabalho.

Dada minha impossibilidade, dedico esta tese aos puros de alma, tidos muitas vezes como ingênuos, aos que sonham com o melhor para si e para os outros, aos que se dedicam incondicionalmente, aos que tem elevado senso de dever em relação aos outros, próximos e subordinados, aos que acreditam no poder transformador do bom exemplo, aos altruístas, aos amorosos com os animais, aos corajosos que podem dar-se ao luxo da transparência, aos generosos, aos solidários na pobre condição humana, aos inteligentes sem arrogância, que dividem com os outros a riqueza de seus conhecimentos e aquisições espirituais, e finalmente, aos capazes de amar desinteressadamente.

A este seleto grupo de raros seres, ungidos ao que deveria representar para toda a espécie, a natureza divina do homem, alguns poucos por mim conhecidos, e do qual minha mãe era uma diletta representante, presto minha homenagem.

AGRADECIMENTOS

Às minhas preciosas amigas, Helena Maria e Vera Regina, pela amizade e pela companhia enriquecedora ao longo da vida e em especial pelo apoio durante os duros e tumultuados momentos pessoais que se sucederam durante a realização deste trabalho.

Ao meu querido amigo Alan, pela atenciosa ajuda com as planilhas e pelo carinho com que me ouviu durante o ano de 2010.

À Cristina Helena, pelos quase cinquenta anos de amizade, que ainda se mantém fresca e amorosa, como nos primórdios da infância.

Ao meu irmão Alexandre, pelo aconchego familiar, com admiração por ter cristalizado em seu núcleo, tudo o que uma verdadeira família deve agregar.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVO GERAL	21
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
	3.1. Casuística	22
	3.2. Construção do TMA	23
	3.3. Preparo das lâminas de TMA	23
	3.4. Técnica de imunohistoquímica	24
	3.5 Recuperação antigênica	25
	3.6 Bloqueio da peroxidase endógena	25
	3.7 Sistema de amplificação da reação	25
	3.8 Revelação com cromógeno e contracoloração	26
	3.9. Desidratação e montagem	26
	3.10 Avaliação imunohistoquímica	27
	3.11 Avaliação estatística	28
4.	RESULTADOS	29
	4.1. Expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno	30
	4.2. Expressão imunohistoquímica das citoqueratinas	35
	4.3. Expressão imunohistoquímica de Par-4	38
	4.4. Avaliação imunohistoquímica de Osteonectina	42
	4.5. Expressão imunohistoquímica de NDRG1	46
	4.6. Expressão imunohistoquímica de Pontina	52
5.	DISCUSSÃO.....	56
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo da hierarquia de diferenciação epitelial mamária e sua relação com os subtipos de carcinoma da mama	4
Figura 2:	Aspecto histológico das estruturas normais da glândula mamaria, das lesões proliferativas e das lesões precursoras do carcinoma ductal invasivo da mama.....	9
Figura 3:	Representação esquemática das possíveis vias de progressão do carcinoma mamário, segundo Buerger et al. (2001)	12
Figura 4:	Elementos ilustrativos da expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno em adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA	32
Figura 5:	Elementos ilustrativos da expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno em hiperplasia epitelial, metaplasia apócrina e papilomatose de pequenos ductos presentes no TMA	33
Figura 6:	Distribuição da expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno, de acordo com as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	34
Figura 7:	Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de citoqueratinas de alto e baixo peso molecular em hiperplasia epitelial e adenose apócrina do TMA (padrão em mosaico)	36
Figura 8:	Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de citoqueratinas de alto e baixo peso molecular em papiloma de pequenos ductos, metaplasia apócrina e alteração colunar	37
Figura 9:	Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de Par-4 em amostras de adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA	39
Figura 10:	Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de Par-4 em amostras de hiperplasia epitelial, papiloma, papiloma de pequenos ductos e metaplasia apócrina presentes no TMA.....	40
Figura 11:	Distribuição da expressão imunohistoquímica nuclear de Par-4, de acordo com as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA.....	41
Figura 12:	Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de Par-4, de acordo com as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	41

Figura 13:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de osteonectina em adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA	43
Figura 14:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de osteonectina em hiperplasia epitelial, papiloma de pequenos ductos e papiloma presentes no TMA	44
Figura 15:	Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de Osteonectina, de acordo com as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	45
Figura 16:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de NDRG1 em adenose esclerosante, alteração colunar, papiloma e papiloma de pequenos presentes no TMA.....	48
Figura 17:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de NDRG1 em adenose apócrina, alteração colunar, metaplasia apócrina e papiloma de pequenos ductos presentes no TMA	49
Figura 18:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de NDRG1 em hiperplasia epitelial, papiloma e papiloma de pequenos ductos presentes no TMA	50
Figura 19:	Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de NDRG1, de acordo com as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	51
Figura 20:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de Pontina em adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA	53
Figura 21:	Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de Pontina em hiperplasia epitelial, papiloma e papiloma de pequenos ductos presentes no TMA.....	54
Figura 22:	Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de Pontina, de acordo com as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Risco relativo de carcinoma invasivo após diagnóstico de ALH relacionado à idade por ocasião da biópsia e história familiar*	7
Tabela 2:	Risco relativo de carcinoma invasivo após diagnóstico de ADH relacionado à idade por ocasião da biópsia e história familiar*	8
Tabela 3:	Anticorpos utilizados, especificidade, origem, diluição e procedência ..	24
Tabela 4:	Distribuição das pacientes amostradas no TMA, segundo número final de lesões proliferativas avaliadas por paciente. Hospital Pérola Byington, São Paulo, 2005/2006	30
Tabela 5:	Associação entre a expressão do receptor de estrógeno e lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	34
Tabela 6:	Associação entre a expressão citoplasmática de Osteonectina e lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	45
Tabela 7:	Distribuição da imunoexpressão de osteonectina em células estromais alongadas, segundo as classes de lesões mamárias presentes no TMA ..	46
Tabela 8:	Associação entre a expressão de NDRG1 e lesões proliferativas mamárias presentes no TMA	51
Tabela 9:	Associação entre a expressão de Pontina e lesões proliferativas mamárias presentes no TMA.....	55

RESUMO

Felippe Barboza R. Estudo da expressão de NDRG1, Par-4, Osteonectina e Pontina em lesões hiperplásicas da mama através da técnica de imunohistoquímica. [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010. 75p.

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é uma das mais importantes causas de mortalidade feminina no mundo. Acredita-se que as lesões proliferativas do parênquima mamário sejam marcadoras de risco para câncer ou precursoras do carcinoma mamário. Apesar da intensa pesquisa na área do câncer de mama, os eventos moleculares precoces associados à evolução e progressão do câncer mamário ainda são pouco conhecidos. **OBJETIVOS:** Com a expectativa de melhor compreender os eventos iniciais da carcinogênese mamária examinamos um conjunto de oitenta e quatro lesões proliferativas mamárias quanto à expressão dos genes N-myc down regulated gene (NDRG1), Prostate Apoptosis Response-4 (PAR-4), Osteonectina e Pontina. A expressão destes genes foi documentada, por trabalhos prévios em nosso laboratório ou por estudos de outros autores, como tendo impacto na evolução do câncer de mama. **MÉTODOS:** Construímos um TMA com lesões proliferativas da mama e testamos este TMA por método imunohistoquímico para NdrG1, Par-4, Osteonectina e Pontina, bem como para o receptor de estrógeno e citoqueratinas de alto e baixo peso molecular, com o objetivo de caracterizar as lesões presentes no TMA. A avaliação imunohistoquímica foi feita de forma quantitativa, com o aplicativo e sistema de análise quantitativa para TMA ACIS III, da Dako. **RESULTADOS:** Após excluirmos amostras não informativas, contamos com 68 amostras de lesões proliferativas mamárias para análise. Nestas, observamos uma notável positividade de NDRG1, em lesões com morfologia apócrina. Observamos ainda alta expressão de NDRG1 em lesões proliferativas mamárias, quando comparadas aos outros tipos de lesões presentes no TMA. Pontina exibiu os mais altos valores de expressão nos casos de lesões proliferativas mamárias, com valor de *p* estatisticamente significativo. A expressão de PAR-4 foi predominantemente nuclear nas lesões mamárias analisadas no TMA. Osteonectina teve expressão diferenciada no epitélio de lesões hiperplásicas da mama, papilomas e papilomas de pequenos ductos, quando comparada às outras lesões presentes no TMA. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados sugerem uma possível associação entre a expressão de NDRG1 e diferenciação apócrina no parênquima mamário. Esta observação está de acordo com os dados publicados a respeito da superexpressão de NDRG1 e a “assinatura apócrina molecular” de alguns carcinomas de mama. Também demonstramos superexpressão de NDRG1 em condições hiperproliferativas do parênquima mamário, não associadas à diferenciação apócrina. Até o momento não há informações na literatura que possam explicar a translocação nuclear de Par-4 em lesões benignas da mama observada em nosso estudo. Nossos achados fornecem pela primeira vez evidências de que PAR-4 é ativado em lesões proliferativas da mama, indicando a necessidade de estudos futuros dirigidos à investigação das funções de PAR-4 em tecido mamário não neoplásico. O presente trabalho também indicou uma possível ação coordenada entre a expressão de Osteonectina e NDRG1, pelo menos em lesões apócrinas mamárias. A expressão estromal de Osteonectina pareceu ser menos frequente em lesões mamárias com arquitetura papilífera, quando comparadas a lesões mamárias com tendência a recapitular a arquitetura lobular.

Descritores: neoplasias de mama, doenças mamárias, expressão gênica, Osteonectina, N-Myc downregulated gene-1, RUVBL1, Prostate apoptosis response-4.

SUMMARY

Felippe Barboza R. Study of NDRG1, Par-4, Osteonectin and Pontin expression in hyperplastic breast lesions with immunohistochemical technique [Thesis]. São Paulo. São Paulo University Medicine Faculty, 2010. 75p.

INTRODUCTION: Breast cancer is a leading cause of death among women all over the World. Proliferative lesions of the breast are believed to be precursors of or markers of increased risk for breast carcinoma. Although the active research in the field of breast cancer, the early molecular events associated with cancer evolution and progression are still poorly understood. **OBJECTIVES:** In order to better understand the early events in the breast carcinogenesis, we examined a set of eighty-four proliferative lesions of the breast for the expression of N-myc down regulated gene (NDRG1), Prostate Apoptosis Response-4 (PAR-4), Osteonectin and Pontin, which expression was previously shown by our laboratory to have impact in breast cancer prognosis. **METHODS:** A tissue microarray were constructed and immunohistochemically tested for NdrG1, Par-4, Osteonectin and Pontin together with estrogen receptor, low and high weight cytokeratins, aiming to properly characterize the lesions sorted in the tissue microarray. Immunohistochemistry assessment was made quantitative, with the ACIS III Dako quantitative analysis system and TMA application software. **RESULTS:** After excluding non informative cores, cores with fibroadipose tissue or mammary parenchyma with normal appearing breast epithelium, we ended up with a TMA with 68 breast lesions. Of those, we observed a noticeable positivity of NdrG1 for lesions with apocrine morphology. Additionally, all cases of florid epithelial hyperplasia showed variable high immunoexpression levels of protein, when compared to the other sorted out lesions in the TMA. Pontin expression level was highest among the breast hyperplasia cases, with statistically significant *p* value. PAR-4 protein expression was found to be predominantly localized in the nucleus in the non-malignant breast lesions analyzed. Osteonectin exhibited differentiated expression values in the epithelium of hyperplastic breast lesions, papillomas and multiple papillomas when compared to the other types of breast lesions assorted in the TMA. **CONCLUSIONS:** Our results suggest a possible association of NDRG1 with apocrine differentiation in the breast parenchyma. This observation are consonant with the publish data about the NDRG1 overexpression and the “apocrine signature” of some mammary cancers. Additionally, we demonstrated that NDRG1 is also overexpressed in some hyperproliferative breast conditions unassociated with apocrine morphology. At present, there is no data available in the in the literature to explain the nuclear translocation of Par-4 in benign breast lesions as observed in our study. However, our findings provide for the first time evidence that PAR-4 is activated in proliferative lesions of the breast indicating that further clinical and experimental studies aiming to investigate PAR-4 function in non neoplastic breast tissue are warranted. Our study also indicated a possible coordinated expression between Osteonectin and NDRG1, at least in apocrine lesions of the breast. Stromal Osteonectin expression seemed to be less intense in breast lesions with papillary architecture, when compared to breast lesions with tendency to recapitulate breast lobular architecture.

Descriptors: breast neoplasm, breast diseases, gene expression, osteonectin, N-Myc downstream regulated gene, Prostate apoptosis response – 4, RUVBL1

1. INTRODUÇÃO

No mundo, o câncer de mama é a principal causa de morte por neoplasias entre mulheres, com alta prevalência em economias desenvolvidas, onde ocorrem mais da metade dos casos mundiais de câncer desta glândula. A incidência de câncer de mama aumenta com a faixa etária, sendo que a maior parte dos casos ocorre entre os 65 e 70 anos. No Brasil as taxas de incidência média corrigidas por idade por 100 000 habitantes apontam São Paulo com as maiores taxas (1997-1998: 94,0/100 000), consistente com a observação de maior incidência em áreas de economia afluenta. As estatísticas brasileiras estimam que aproximadamente 50% das mulheres acometidas por câncer de mama venham a morrer da doença cinco anos após o diagnóstico (Brasil. Instituto Nacional do Câncer). Estudos epidemiológicos relacionam como fatores associados ao desenvolvimento do carcinoma de mama, a nuliparidade, a menarca precoce, a menopausa tardia, e a gravidez em idade mais avançada (Duffy MJ 2006). A avaliação destes fatores leva-nos a inferir que a exposição precoce a influência hormonal, principalmente estrogênica, bem como a exposição prolongada aos hormônios sexuais, no caso de menopausa tardia, aumenta o risco para câncer, evidenciando, ainda que de forma indireta, a importância dos hormônios sexuais na patogênese do carcinoma mamário. No caso da gravidez, quanto mais cedo ocorre gestação a termo, menor o risco de desenvolvimento de câncer no período de vida da mulher. Com base nesta observação propõe-se que o desenvolvimento pleno da glândula mamária, quando ocorre em idade precoce, é fator protetor contra o carcinoma de mama (Kelsey et al. 1993). Trabalhos em ratos e camundongos corroboram os achados epidemiológicos em humanos sobre o efeito protetor da

gestação a termo no câncer de mama (revisão em Medina 2005) e sugerem que a alteração do ambiente hormonal na mama, causado pela gravidez, leva a modificações permanentes nas vias moleculares que governam o destino celular, com relação a sua suscetibilidade ao carcinoma mamário. Ginger et al. (2001) e Sivaranam et al. (2001) propõem que alterações epigenéticas, remodelação de cromatina, modificações em seqüências promotoras, recrutamento de proteínas ligantes, como possíveis responsáveis por estas modificações, fornecendo, desta forma, subsídios experimentais para as observações epidemiológicas sobre o papel do estrógeno e progesterona na patogênese do carcinoma mamário.

O receptor de estrógeno foi descoberto em 1960 e clonado na década de 1980. O uso primário da avaliação da expressão do receptor de estrógeno no carcinoma de mama é preditivo com relação à resposta ao tratamento hormonal. Dois terços das pacientes com carcinoma de mama expressam receptor de estrógeno e estas pacientes têm chance sete à oito vezes maior de se beneficiar da terapêutica endócrina do que as pacientes que não expressam receptor de estrógeno (Duffy 2006; Nagai e Brentani 2008).

Estudos do perfil de expressão gênica diferenciada em carcinomas de mama e em linhagens celulares de carcinoma mamário demonstraram que estas neoplasias segregam primariamente em dois grupos, segundo o padrão de expressão do receptor de estrógeno e dos genes por ele regulados (Sorlie et al. 2001; de Longueville et al. 2005), o que sugere o estrógeno e as vias por ele reguladas como importantes na patogênese do câncer nesta glândula. Clinicamente observa-se que os carcinomas ER- e ER+ são bastante diferentes quanto às lesões precursoras ou marcadoras de risco que antecedem o estabelecimento da neoplasia bem como quanto ao

comportamento biológico e a resposta terapêutica do carcinoma, uma vez instalado (Sorlie et al. 2001; Lopez-Garcia et al. 2010). No ramo definido pela expressão do receptor de estrógeno se encontram os subtipos luminal A e B do carcinoma de mama. O subtipo luminal A caracteriza-se por apresentar ativa a via dos genes regulados pelo receptor de estrógeno e pela baixa expressão dos genes relacionados à proliferação celular, sendo em geral de baixo grau histológico e de excelente prognóstico clínico. O subtipo luminal B exibe grau histológico e taxa de proliferação mais altas e prognóstico pior em relação ao subtipo luminal A. O ramo dos tumores ER- é heterogêneo e compreende os subtipos *normal breast-like*, o subtipo HER-2 e o basalóide. Os subtipos HER-2 e basalóide têm comportamento agressivo, sendo que o subtipo HER-2 é caracterizado pela amplificação da via do amplicon do HER-2 e o basalóide pela expressão de citoqueratinas de alto peso molecular, sendo o último notavelmente semelhante aos tumores originados em pacientes portadoras de mutação em BRCA1 (Weigelt et al 2010).

Baseado no perfil de expressão gênica do carcinoma de mama e na hipótese da existência de células tronco mamárias, Prat e Perou (2009) propuseram um interessante modelo onde carcinomas desta glândula originar-se-iam em células seqüestradas em estágios específicos de diferenciação, causados pela alteração da expressão de *claudina*, por mutações no gene BRCA1 ou pela superexpressão do amplicon do HER-2, conforme esquema representado na figura 1. Assim sendo é possível especular que a alteração da expressão destes genes ou de outros regulados por eles, possam estar presentes já no estágio precoce de evolução neoplásica, em tese, representado pelas lesões proliferativas mamárias.

Figura 1: Modelo da hierarquia de diferenciação epitelial mamária e sua relação com os subtipos de carcinoma da mama

Modificado de Prat A & Perou CM. Nature Medicine 15: 842-844, 2009.

Mutações herdadas em genes supressores de tumor que regulam vias críticas para a integridade do genoma, como BRCA1 e BRCA2, conferem altíssimo risco para câncer de mama. PTEN e TP53 além de conferirem alto risco para o desenvolvimento do câncer de mama em sua forma familiar também estão associados a outras síndromes genéticas raras. Outros genes de menor penetrância como CHEK2, ATM, NBS1, RAD50, BRPI e PALB2 conferem risco dobrado para câncer às pacientes portadoras destas alterações. No entanto somente 50% dos carcinomas hereditários de mama estão relacionados à presença de mutações conhecidas em genes supressores de tumor, sendo que os demais casos não se enquadram em mutações de genes conhecidos (Walsh e King 2007). A maioria dos carcinomas esporádicos de mama têm origem em mutações variadas, muitas desconhecidas, que

levam a alterações em vias genéticas diversas, que resultam na heterogeneidade clínica e molecular destas neoplasias.

Uma das mais importantes alterações em vias de sinalização celular observadas em cânceres esporádicos da mama está relacionada ao HER-2. O proto-oncogene HER-2 está localizado no cromossomo 17q e codifica um receptor para fator de crescimento pertencente ao grupo de receptores tirosina-quinase. A super-expressão do HER-2 pode ser considerada um evento precoce na patogênese do carcinoma mamário, já que ocorre frequentemente nos carcinomas *in situ* da mama (Friedländer et al. 2007). O HER-2 está superexpresso em 10 a 30% dos carcinomas mamários invasivos, sendo que esta alteração de expressão está associada a um menor tempo de sobrevida global e de sobrevida livre de doença. A amplificação do gene mantém sua força prognóstica, mesmo quando ajustada com outros fatores prognósticos clássicos (Slamon et al. 1987). O HER-2 foi o primeiro gene alvo de terapias com anticorpos humanizados (Trastuzumab-rhu4d5-Herceptin®) aprovado pelo FDA (Friedländer et al. 2007) e uma meta-análise dos estudos nesta área aponta uma tendência da hiperexpressão do HER-2 como fator preditivo de sensibilidade a quimioterapia com adriamicina e de resistência a terapêutica hormonal com Tamoxifen (revisão em Ross e Fletcher 1998).

Estudos em ratos corroboram as observações clínicas e indicam que a superexpressão do HER-2 está associada ao aumento da atividade proliferativa e das capacidades metastática e tumorigênica em linhagens de células mamárias normais e provenientes de carcinoma de mama (Korkaya et al. 2008). Tomadas em conjunto, estas observações sugerem um papel para o HER-2 na patogênese do carcinoma mamário.

No modelo de carcinogênese em geral, bem como no da glândula mamária, admite-se a progressão para neoplasia a partir de lesões hiperplásicas ou proliferativas benignas. A progressão neoplásica dar-se-ia com o progressivo acúmulo de alterações genéticas, por vezes traduzidas em um espectro concomitante de alterações morfológicas.

O postulado de que lesões proliferativas mamárias são precursoras do carcinoma nesta glândula datam de meados do século passado e foi inicialmente baseado na observação histológica de um *continuum* entre estas lesões e o carcinoma invasivo e no fato de que mamas portadoras de carcinoma albergavam mais freqüentemente lesões proliferativas mamárias (revisão em Allred et al. 2001). O trabalho de Page et al. (1985) definiu de forma sistemática os critérios diagnósticos das lesões hiperplásicas da mama e demonstrou evidências epidemiológicas consistentes de que a presença destas lesões confere às mulheres portadoras um risco relativo aumentado de desenvolvimento posterior de carcinoma na glândula mamária. As lesões proliferativas caracterizam-se histologicamente por um aumento do número de camadas do revestimento de ductos e lobos mamários, normalmente em número de duas, uma externa, junto à membrana basal, constituída por células mioepiteliais, e uma interna, constituída por células epiteliais diferenciadas. Em geral, há um aumento de volume de ácinos e ductos, concomitante ao aumento do número de células do revestimento destas estruturas. No trabalho de 1985, Page et al. estabeleceram que o risco relativo aumentado de câncer mamário associado a essas lesões está relacionado ao grau de proliferação do epitélio, sendo que as lesões com risco aumentado significativo são representadas pela hiperplasia epitelial atípica e pelo carcinoma *in situ*. O risco estimado para desenvolvimento de carcinoma conferido pelo achado destas lesões é modulado por fatores epidemiológicos

específicos relacionados à história gestacional e familiar de câncer mamário das mulheres portadoras destas alterações, conforme observado nas tabelas 1 e 2. Microfotografias da figura 2 mostram os aspectos morfológicos das lesões proliferativas mamárias.

Tabela 1: Risco relativo de carcinoma invasivo após diagnóstico de ALH relacionado à idade por ocasião da biópsia e história familiar*

	Nº mulheres	Nº câncer	Risco relativo	95% CI	Valor de p
Todas as mulheres ALH	126	16	4.2	(2.6-6.9)	<0,000001
História familiar -	107	11	3.5	(1.9-6.2)	0,00001
História familiar +	19	5	8.4	(3.5-2.0)	<0,000001
Idade 20-30 anos	5	0	0.0	-	0.78
Idade 31-45 anos	52	4	2.7	(1.0-7.2)	0,039
Idade de 46-55 anos	59	12	6.4	(3.6-11.0)	<0,000001
Idade 56-65 anos	8	0	0.0	-	0,60
Maior 65 anos	2	0	0.0	-	0,80

Page et al. (1985)

*comparado com mulheres do estado de Atlanta (Third National Cancer Society Survey), controlado por idade e número de anos em risco de carcinoma

ALH: *Atypical lobular hyperplasia* CI: *confidence interval*

Tabela 2: Risco relativo de carcinoma invasivo após diagnóstico de ADH relacionado à idade por ocasião da biópsia e história familiar*

	Nº mulheres	Nº câncer	Rico Relativo	95% CI	Valor de <i>p</i>
Todas as mulheres ADH	150	18	4.3	(2.7-6.9)	<0,000001
Historia familiar -	122	11	3.2	(1.8-5.8)	0.00004
Historia familiar +	28	7	9.7	(4.7-20)	<0.000001
Idade 20-30 anos	14	1	7.0	(0.98-50)	0.024
Idade 31-45 anos	60	7	4.5	(2.1-9.4)	0.00001
Idade 46-55 anos	51	6	3.5	(1.6-7.7)	0.001
Idade 56-65 anos	10	2	6.5	(1.6-36)	0.002
Maior 65 anos	15	2	5.0	(1.2-20)	0.012

Page et al. (1985)

*comparado com mulheres do estado de Atlanta (Third National Cancer Society Survey), controlado por idade e número de anos em risco de carcinoma

ADH: *Atypical ductal hyperplasia* CI: *confidence interval*

Figura 2: Aspecto histológico das estruturas normais da glândula mamária, das lesões proliferativas e das lesões precursoras do carcinoma ductal invasivo da mama

A: árvore mamária normal com ductos e lóbulos compostos por ácinos na extremidade dos ductos terminais; B: ácinos mamários normais com dupla camada de células de revestimento; C: hiperplasia epitelial no interior de ducto mamário. Note a obliteração da luz em comparação com estrutura à esquerda, de aspecto normal; D: hiperplasia epitelial sem atipia, maior aumento da figura C. Notar o pleomorfismo das células e o aspecto aparentemente desorganizado da proliferação celular; E: hiperplasia epitelial sem atipia. Observar o aspecto irregular dos espaços luminiais; F: hiperplasia epitelial atípica. Notar a tendência a regularidade dos espaços luminiais; G e H: carcinoma ductal *in situ*. Observe a monotipia celular e os espaços luminiais organizados e de tamanho regular.

Cabe ressaltar que embora as lesões proliferativas compartilhem algumas características morfológicas com o carcinoma *in situ* da mama, mesmo no seu pólo atípico, estas lesões estão restritas por membrana basal, não tem capacidade invasiva e conferem às pacientes portadoras destas lesões um risco aumentado para câncer que é bilateral e não está relacionado ao sítio de diagnóstico inicial da alteração no parênquima mamário. Uma vez retiradas, não exibem potencial de recorrência.

Adicionalmente às lesões proliferativas previamente descritas, o uso do rastreamento mamográfico do câncer de mama resultou em um aumento da detecção de lesões não abordadas por Page et al. (1978 e 1985). Estas lesões estão frequentemente associadas à presença radiográfica de microcalcificações e tem sido descritas sob uma gama variada de denominações: lóbulos císticos atípicos, alteração colunar atípica com brotamentos apicais e secreção proeminente, alteração colunar e alteração colunar atípica. O risco para câncer associado a estas lesões ainda não foi determinado (Schnitt e Vincent-Solomon 2005).

Embora o trabalho de Page et al. (1985) tenha feito importante contribuição para o entendimento das lesões proliferativas mamárias e sua relação com o desenvolvimento de câncer nesta glândula, um modelo de progressão linear de hiperplasia a carcinoma, como o estabelecido para os tumores colo-retais (Vogelstein et al. 1988), não foi demonstrado na glândula mamária e não há como predizer, até o momento, quais dos indivíduos, dentro dos grupos de risco, virão a desenvolver o carcinoma de mama, já que o câncer não ocorre invariavelmente em todos os indivíduos portadores destas lesões.

Buerger et al (1999) propuseram, a partir dos resultados obtidos no estudo de alterações genéticas em carcinomas *in situ* e invasivos da mama, que ocorreriam diferentes vias evolutivas para o carcinoma desta glândula, baseados na observação de que diferentes tipos de carcinoma *in situ* da mama albergam diferentes alterações genéticas e que estas alterações genéticas são semelhantes às observadas em suas contrapartidas invasivas do carcinoma mamário. Posteriormente Buerger et al. (2001) propuseram “vias de baixo grau” e de “alto grau” para o carcinoma mamário, onde as “vias de baixo grau”, hipoteticamente originárias dos carcinomas bem diferenciados da mama, seriam caracterizadas por perdas em 16q. Uma possível rota de transição de tumores bem diferenciados com perdas em 16q para tumores moderadamente diferenciados dar-se-ia através de ganhos em 1q e perdas em 11q. Ganhos posteriores resultando tanto em carcinomas *in situ* quando em invasivos pouco diferenciados incluem 11q13, 17q12 e 20q13. Nos estudos de Buerger et al. (2001) ganhos em 1q e 8q estão presentes em todas as vias, tendo os autores considerado estas alterações genéticas como sendo características dos eventos iniciais da carcinogênese mamária, conforme sumarizado em esquema da figura 3.

Figura 3: Representação esquemática das possíveis vias de progressão do carcinoma mamário, segundo Buerger et al. (2001).

Modificado de W. Boecker. Preneoplasia of the breast. A new conceptual approach to proliferative breast disease. Elsevier GmbH Munich 2006, capítulo 17, pag. 340.

Apesar da concepção da progressão linear do câncer de mama ser provavelmente uma super simplificação de um processo bastante complexo, possivelmente envolvendo muitos caminhos genéticos (Buerger 2001, Ellis 2010 Lopez-Garcia et al. 2010), este modelo tem sido útil como hipótese de trabalho na investigação dos eventos precoces da carcinogênese mamária.

Trabalhos do começo da década de 2000, que avaliaram a taxa de proliferação celular e sua relação com o receptor de estrógeno em lesões proliferativas da mama, forneceram relevantes conhecimentos da biologia destas alterações. Na mama normal e em lesões proliferativas não associadas a aumento significativo do risco relativo para câncer na glândula há uma associação negativa entre a expressão do receptor de estrógeno e o índice de proliferação celular, medido pelo marcador Ki-67, indicando que células ER+ não se dividem ou que o receptor é hiporegulado por ocasião da

proliferação das células mamárias. Iqbal et al. (2001) demonstraram que mesmo em lesões proliferativas sem atipias, ou seja, com baixo risco relativo de evolução para câncer, já se observa uma alteração na regulação do receptor de estrógeno, caracterizada pela sua expressão em células em proliferação, discriminadas pela expressão concomitante da proteína Ki-67. A associação negativa entre expressão do receptor de estrógeno e o marcador de proliferação Ki-67 é perdida em graus variados em lesões proliferativas, dependendo do risco relativo para câncer a elas associado, risco este estimado segundo avaliação morfológica das lesões, dentro dos critérios anteriormente descritos (Page et al. 1985). Estes autores sugerem a expressão anômala do receptor de estrógeno como uma alteração potencialmente importante na gênese do carcinoma de mama. Nesta linha, estudo retrospectivo de Shaaban et al. (2002) avaliou a expressão do receptor de estrógeno e do marcador de proliferação Ki-67 em um grupo de lesões proliferativas mamárias de padrão usual (sem atipia) proveniente de pacientes que desenvolveram posteriormente carcinoma de mama, comparado ao grupo controle de pacientes com lesões semelhantes que não desenvolveram câncer, pareado por idade e data de biópsia. Shaaban et al. (2002) observaram que a expressão do receptor de estrógeno e de Ki-67 era significativamente maior no grupo das pacientes portadoras de lesões hiperplásicas que progrediram para câncer do que o observado nas pacientes do grupo controle. Shaaban et al. (2002) concluem pela dependência da expressão do receptor de estrógeno na progressão das hiperplasias usuais da mama.

Especificamente com relação à HER-2, estudo de Stark et al. (2000) comparou a superexpressão e amplificação de HER-2 em lesões proliferativas mamárias de pacientes que posteriormente desenvolveram câncer de mama com lesões pareadas de mulheres que não desenvolveram câncer em período de

seguimento médio de 10,2 anos e observaram risco substancialmente aumentado, de 7,2 (CI 0,9 a 60,8), para desenvolvimento de câncer mamário no grupo com superexpressão ou amplificação do HER-2. Segundo Stark et al. (2000), suas observações fornecem evidências de que alterações genéticas, incluindo a amplificação de HER-2, podem ocorrer como eventos precoces no desenvolvimento do carcinoma de mama.

Com o objetivo de identificar genes envolvidos na transformação mediada pelo HER-2, Mackay et al. (2003) e dos Santos et al. (2006) utilizando métodos diferentes, compararam o perfil de expressão gênica de linhagem de células luminais mamárias humanas HB4, com o perfil de expressão gênica de linhagens de células mamárias que apresentam diferentes níveis de expressão de HER-2, estas últimas resultantes da transfecção de células parentais HB4 com cDNA do HER-2. Entre os genes obtidos como hiporegulados na vigência de superexpressão de HER2 estão a Osteonectina ou SPARC e o RUVBL1. Entre os genes hiperexpressos na vigência de superexpressão de HER-2, Mackay et al. obtiveram alguns regulados pelo MYC, como o NDRG1 (*N-myc down regulated gene 1*).

O RUVBL1 ou Pontina é gene altamente conservado nos eucariotos, que codifica proteína que pertence à família AAA + de ATPases. As AAA+ ATPases (ATPases Associadas a várias Atividades celulares) são um grupo de proteínas que se ligam ao nucleosídeo trifosfato promovendo sua hidrólise e conseqüente transdução da energia obtida para exercer força mecânica que desencadeia alteração na conformação de suas subunidades. Este grupo de ATPases possui, além do domínio de ligação ao nucleosídeo trifostato, um domínio “adaptador” a substratos que variam conforme a atividade a ser exercida pela proteína. As atividades das ATPases incluem a degradação de proteínas, atividade de helicase, iniciação da

replicação do DNA e transporte dentro da célula. (revisão em Tucker e Sallai 2007). O RUVBL1 ou Pontina tem importante papel na remodelação de cromatina, na regulação da transcrição e desenvolvimento celular, bem como no reparo do DNA (Qiu et al. 1998, Tucker e Sallai 2007). Até o momento, não há estudos publicados quanto à expressão de Pontina em carcinomas de mama ou em tecido mamário normal e hiperplásico.

O gene SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) também conhecido como BM40 e Osteonectina, codifica glicoproteína matricelular secretada por vários tipos celulares e está localizado no cromossomo 5q31-q33. SPARC tem função na modulação da interação célula-célula e célula matriz, apresenta propriedades contra adesivas e anti crescimento em células não transformadas. A relação entre a expressão de SPARC e prognóstico de neoplasias varia conforme o tipo de tecido no qual se origina o tumor estudado. Em gliomas e melanomas a expressão da proteína está relacionada a comportamento altamente agressivo destas neoplasias, ao mesmo tempo em que tem sido referido como supressor de tumor em carcinomas ovarianos, neuroblastomas e carcinomas colo-retais (revisão em Tai e Tang 2008).

Estudos clínicos em carcinomas mamários humanos evidenciaram expressão elevada de SPARC nestas neoplasias, com o resultado da maior parte destes trabalhos associando hiperexpressão de SPARC a fatores prognósticos clássicos de má evolução tumoral e a pior sobrevida no seguimento, sendo que a expressão desta proteína despontou como fator prognóstico independente de pior evolução em um destes estudos (Watkins et al. 2005)

Por outro lado, estudo de Nagai et al. (2010a) em grupo de 596 pacientes portadoras de carcinoma de mama com dez anos de seguimento, demonstrou que a

hiporegulação de SPARC nestas neoplasias potencializa o efeito prognóstico deletério associado a hiperexpressão de NDRG1 observado no estudo.

Embora o papel do SPARC nas neoplasias mamárias seja controverso, é clara a superexpressão da proteína em carcinomas, quando comparada ao tecido mamário normal (Porter et al. 2001). Este fato associado à observação das propriedades anticrescimento em células não transformadas faz do gene objeto de estudo interessante, na avaliação de alterações que possam ser importantes para a aquisição e manutenção do fenótipo maligno em células mamárias (Porter et al. 2001, Jones et al. 2004).

NDRG1 (*N-myc down regulated gene 1*) está localizado no cromossomo 8q24 e apresenta expressão predominantemente citoplasmática. Alterações em NDRG1 causam neuropatias motoras e sensoriais periféricas desmielinizantes hereditárias, caracterizadas pela disfunção de células de Schwann, (revisão em Ellen et al. 2008), mas um dos aspectos de maior interesse neste gene é a sua expressão aumentada em condições de hipóxia, que são altamente prevalentes em tumores sólidos. Em situações de hipóxia e condições de apoptose celular é regulado de forma diferenciada por HIF-1 e TP53 (Stein et al. 2004). Em células em diferenciação, NDRG1 é superexpresso, sendo reprimido pelo MYC em células terminalmente diferenciadas (Jian et al. 2008, Lachat et al. 2002). Com exceção de tumores do trato gastrointestinal, onde NDRG1 é hiporegulado (Kewei et al. 2010, Cangul et al. 2002), este gene está em geral superexpresso em linhagens celulares de carcinoma e em carcinomas humanos, inclusive de mama (Gerhardt et al. 2010, Nagai et al. 2010a, Fotovati et al. 2006).

No carcinoma de endométrio a hiperexpressão de NDRG1 está presente e relacionada à perda de expressão de PTEN (Jiawei et al. 2007).

O primeiro trabalho a estudar a expressão de NDRG1, dentro do cenário clínico do carcinoma mamário, foi realizado por Bandyopadhyay et al. (2004), que avaliaram a expressão do gene em 85 pacientes com carcinoma de mama, e observaram que a expressão do NDRG1 estava significativamente reduzida nos carcinomas mamários e que pacientes com expressão alta de NDRG1 evidenciaram prognóstico significativamente mais favorável do que aquelas com baixa expressão do gene ($p = 0,002$ “log rank test”). Contrariamente a Bandyopadhyay et al (2004), Nagai et al. (2010a) observaram que a hiperexpressão de NDRG1, na análise de sobrevida de Kaplan-Meier, estava diretamente associada com menor período livre de doença e com menor sobrevida, com valores de $p = 0,001$ para ambos os fatores analisados. Observação adicional de importância no estudo de Nagai et al. (2010a) refere-se à relação inversa entre a expressão de NDRG1 e a positividade de receptores de estrógeno e progesterona no tecido proveniente dos carcinomas mamários avaliados no estudo. Surpreendentemente, a superexpressão do NDRG1 foi capaz de discriminar pacientes de pior prognóstico entre as pacientes portadoras de carcinomas com fenótipo luminal A, um subgrupo em geral de evolução favorável. Os achados de Nagai et al. (2010a) são consistentes com observações prévias de Fotovati et al. 2006, que observaram a hiperexpressão do NDRG1 em tumores negativos para o receptor e com grau histológico alto.

O PAR-4 (Prostate Apoptosis Response-4) ou PAWR (PKC Apoptosis WT1 Regulator) está localizado no cromossomo 12q21 e foi inicialmente clonado pela indução de apoptose em células prostáticas do rato independentes de andrógeno. Através da técnica de hibridização diferencial, o PAR-4 foi identificado dentro de um grupo de genes expressos em resposta a diminuição do cálcio intracelular. O gene é expresso de forma ubíqua em tecidos de origem ectodérmica, mesodérmica e

endodérmica (Boghaert et al. 1997). A sua expressão, no entanto, não é identificada em alguns tipos específicos de células: linfócitos, células musculares lisas, células diferenciadas do tecido prostático, células epiteliais da glândula mamária e células terminalmente diferenciadas da retina, indicando que o PAR-4 seja hiporegulado durante a diferenciação celular. O PAR-4 tem ação supressora de tumor, estando hiporegulado em carcinomas de células renais, leucemia linfoblástica aguda e leucemia linfóide crônica (Ranganathan e Rangnekar 2005). Além de sua ação supressora nos tumores descritos, postula-se PAR-4 como um potencial gene supressor de tumores em geral, devido a sua ação em vários pontos chave na via extrínseca de apoptose e de sua capacidade única de induzir a apoptose seletiva em células neoplásicas (Donninger 2010, El Guendy et al 2003). Garcia-Cao et al. (2005) demonstraram que camundongos *par-4*^{-/-} desenvolvem espontaneamente lesões proliferativas no endométrio e próstata, porém a ação do PAR-4 no tecido mamário normal e hiperplásico ainda é desconhecida.

Nagai et al. (2010b) realizaram estudo da expressão do gene PAR-4 em TMA contendo 1161 amostras de tumores mamários humanos. Neste estudo, onde a avaliação da expressão do PAR-4 foi feita por método imunohistoquímico, Nagai et al. (2010b) observaram que a hiporegulação da expressão nuclear do gene foi preditiva de pior prognóstico nestas pacientes. A baixa sobrevida observada estendeu-se ainda às pacientes portadoras do subtipo luminal A do carcinoma mamário presentes no estudo. O prognóstico das pacientes foi ainda pior quando a hiporegulação do PAR-4 estava associada à expressão do HER2, EGFR e ativação de pAKT. No mesmo trabalho Nagai et al. (2010b) estudaram a expressão do PAR-4 em cultura tridimensional de células MCF10A através do uso de microscopia confocal e técnica de imunofluorescência, tendo verificado a presença de *par-4* e caspase 3 na

luz dos ácinos formados na cultura tridimensional, indicando que PAR-4 tem papel também na morfogênese mamária.

Os dados aqui apresentados sugerem que as lesões proliferativas mamárias podem evoluir por caminhos diversos, alguns deles possivelmente levando um subgrupo destas lesões ao desenvolvimento de carcinoma de mama. Embora o encontro destas lesões no parênquima mamário defina grupos com risco epidemiologicamente reconhecido de desenvolver câncer, não há, até o momento, marcadores específicos que possam predizer quais indivíduos dentro dos grupos de risco irão desenvolver câncer.

Um dos desafios na pesquisa relacionada ao carcinoma mamário tem sido a caracterização dos eventos moleculares associados com a progressão neoplásica nos tumores epiteliais desta glândula. Partindo do pressuposto de que lesões proliferativas mamárias sejam, em alguns casos, além de marcadores de risco, precursoras do carcinoma de mama e utilizando as evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais da relação do estrogênio e HER-2 na biologia normal da glândula mamária e nos desvios da homeostase que levam à gênese do carcinoma mamário, escolhemos para estudo proteínas reguladas por estes genes, que demonstraram em trabalhos de literatura, papel prognóstico na evolução do câncer mamário, ou cujo papel na fisiopatologia mamária ainda não tenha sido devidamente estudado ou esclarecido, na expectativa de que algumas destas proteínas se mostrem alteradas já em estágios precoces da evolução neoplásica, teoricamente representados pelas lesões proliferativas da mama.

Embora nosso estudo não pretenda estabelecer graus de risco ou valor preditivo às alterações moleculares que, eventualmente, sejam encontradas, em vista das limitações do nosso universo de amostras, acreditamos que a descrição destas

possíveis alterações poderá fornecer subsídios teóricos para modelos atuais e futuros de carcinogênese mamária, além de oferecer objetos de estudo em trabalhos prospectivos controlados com longo período de seguimento, em pacientes portadoras de lesões proliferativas mamárias.

2. OBJETIVO GERAL

Dada a proposição de que as lesões proliferativas mamárias seriam marcadoras de risco ou precursoras do câncer nesta glândula, pretendemos neste trabalho, caracterizar a expressão de NDRG1, PAR-4, SPARC (Osteonectina) e RUVBL1 (Pontina), potenciais marcadores prognósticos do carcinoma mamário, nas lesões proliferativas mamárias, na tentativa de obter subsídios para melhor compreender os eventos precoces envolvidos na progressão neoplásica desta glândula.

Objetivos específicos:

- 1- Caracterizar o padrão de expressão de NDRG1, PAR-4, SPARC e RUVBL1 segundo as classes de lesões proliferativas mamárias e se possível, segundo seus reconhecidos riscos associados ao desenvolvimento de câncer na mama.
- 2- Verificar a existência de uma associação de expressão de NDRG1, PAR-4, SPARC e RUVBL1 nas lesões proliferativas mamárias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram levantados os relatórios anátomo-patológicos de todos os casos submetidos a cirurgia no Hospital Perola Byington, de janeiro de 2005 a maio de 2006, o que resultou num total de 797 casos provenientes de intervenções cirúrgicas para ressecção de nódulos, quadrantes e setores mamários. Destas intervenções, foram selecionados 133 pacientes com diagnóstico anátomo-patológico inicial de lesão proliferativa. As lâminas referentes aos casos de lesão proliferativa mamária com atipia foram revistas para a avaliação da qualidade do material e da presença das lesões de interesse no estudo. Os casos com material de boa qualidade e com lesões de interesse tiveram os blocos submetidos a novos cortes histológicos, que foram mais uma vez avaliados quanto à qualidade do material e presença de lesões de interesse. Dos casos iniciais foram escolhidas lesões de 90 pacientes. Para o TMA foram selecionadas 42 lesões de 28 das 90 pacientes, com tamanho suficiente para serem demarcadas nos blocos de parafina e com material em quantidade satisfatória para cortes em diversos níveis. Das vinte e oito pacientes com lesão proliferativa mamária selecionadas para o TMA, oito eram portadoras de carcinoma mamário com diagnóstico feito concomitantemente. Restaram 62 pacientes para estudo posterior com cortes histológicos convencionais.

3.2 Construção do TMA

As lesões de interesse são circundadas, na lâmina, com caneta hidrográfica marca Pilot para retroprojektor. As lesões marcadas são localizadas no bloco doador, sobrepondo-se a lâmina ao bloco, que foi também marcado com caneta hidrográfica. Para confecção do bloco receptor, as lesões de interesse foram marcadas em cada um dos blocos doadores e puncionadas com agulha de 1,0 mm para retirada de duas amostras de cada área marcada, com o auxílio do dispositivo técnico “*tissue microarrayer*” (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). Os fragmentos cilíndricos, obtidos através da punção, foram transferidos para o bloco de parafina receptor e um mapa indicativo da ordem das amostras no bloco receptor foi construído em planilha Excel®, para a localização de cada caso, dentro do bloco receptor. O bloco receptor foi construído com duas amostras de cada uma das 42 áreas selecionadas, ou seja, 84 fragmentos provenientes de 28 pacientes.

3.3 Preparo das lâminas de TMA

Coloca-se uma fita adesiva sobre bloco do TMA, que é cortado no micrótomo rotativo em cortes seqüências de 4µ cada. A fita adesiva com o material obtido do bloco doador é colada na lâmina apropriada por pressão manual sobre um rolo. A lâmina com o material é irradiada com raios UV por trinta minutos e posteriormente mergulhada em solução solvente (TPC) e seca à temperatura ambiente. Uma vez seca, é retirada a fita adesiva e a lâminas é submetida a um banho de parafina para armazenagem.

3.4 Técnica de imunohistoquímica

As lâminas a serem submetidas a exame imunohistoquímico para a avaliação das proteínas dos genes PAR-4 e SPARC são desparafinadas durante um período de 24 horas em estufa a 60°C, e em seguida passam por banhos sequenciais em xilol a 60°C por 20 minutos, xilol a temperatura ambiente por 20 minutos, etanol 100% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos e etanol a 70% por 30 segundos e em seguida são lavadas em água destilada e corrente. Para os anticorpos usados na avaliação das proteínas dos genes NDRG1 e RUVBL1 o procedimento é semelhante ao descrito acima, com exceção do etanol no segundo banho, que deve ser usado na concentração de 85%, também por 30 segundos. Os anticorpos utilizados nas reações, assim como suas respectivas titulações, especificidades e procedência constam na tabela 3.

Tabela 3: Anticorpos utilizados, especificidade, origem, diluição e procedência

Anticorpos	Classe	Títulos	Fabricante / Códigos
CK5 (Ab1)	XM26	1:300	Neomarkers, cat # M51896
CK 14	LL002	1:400	Biogenex, cat # MU146-UC, San Ramon, Ca, EUA
CK18	DC10	1:800	DakoCytomation cat# M7010
CK 8	35βH11	1:200	DakoCytomation, cat # M631, Glostrup, Dinamarca
ER	SP1 feito em coelho	1:500	Neomarkers, cat# RM9101, Fremont, CA, EUA
NDRG1 (N19)	Policlonal feito em bode	1:1000	Santa Cruz Inc, cat# sc 19464, Santa Cruz, CA, EUA
Osteonectina	Policlonal feito em Coelho	1:1000	Chemicon cat# Ab 1858, Temecula, CA, EUA
PAR-4	Feito em camundongo	1:100	Santa Cruz Inc, cat # sc1666, Santa Cruz, CA, EUA
Pontina52 (N15)	Policlonal feito em bode	1:50	Santa Cruz Inc, cat# sc15259, Santa Cruz, CA, EUA

3.5 Recuperação antigênica

Para a recuperação antigênica, uma solução tampão de citrato 10mM pH6,0 é fervida em panela de pressão destampada. Ocorrida a fervura, as lâminas são mergulhadas na panela de pressão, que é lacrada com válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula é abaixada e aguarda-se a pressurização total. Ocorrido o sinal de pressurização total, espera-se quatro minutos e coloca-se a panela fechado sob água corrente até a despressurização total. Ao final da despressurização, a panela é destampada e as lâminas são lavadas em água destilada e corrente.

3.6 Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio da peroxidase endógena é feito com H₂O₂ a 3%, com quatro trocas de cinco minutos cada. Segue-se lavagem em água corrente e destilada e subsequente, com solução salina tamponada com fosfatos 10mM pH 7,4 por cinco minutos. As lâminas com os anticorpos primários diluídos (tabela 3) são incubadas em tampão PBS contendo albumina bovina 1% e azida sódica 0,1%, em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Após a incubação em câmara úmida procede-se à lavagem em PBS com três trocas de 3 minutos cada.

3.7 Sistema de amplificação da reação

A amplificação da reação compreende a incubação das lâminas por 30 minutos a 37°C com o “Post Primary Block” (NovoLink Max Polimer cod # RE7260-κ, Reino Unido). Terminada a incubação das lâminas para amplificação da reação procede-se à lavagem das lâminas com tampão PBS, com três trocas de três minutos cada. No caso dos anticorpos para as proteínas *ndrg1* e *pontina*, a incubação

é feita com o anticorpo secundário biotinilado (Biotinylated Link Universal) do kit LSAB+ System – HRP (DakoCytomation, K0690, Carpinteria, CA, EUA). Terminada a incubação com o anticorpo primário biotinilado faz-se a lavagem de forma semelhante à dos outros antígenos, com posterior incubação com o complexo Streptavidin-HRP, por 30 minutos a 37°C. Em seguida, nova lavagem com tampão PBS com três trocas de três minutos cada.

3.8 Revelação com cromógeno e contracoloração

Para a revelação com cromógeno as lâminas são incubadas em solução substrato constituída por 100mg% de 3,3' Tetrahydroclorido Diaminobenzidina e 110ml de PBS por 5 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Nas lâminas controle deve-se observar no microscópio o desenvolvimento de precipitado castanho dourado como produto final da reação. Terminada a reação, as lâminas são lavadas em água corrente e destilada, por três minutos. As lâminas são contracoradas com Hematoxilina de Harris por um minuto. Em seguida as lâminas são lavadas em água corrente e destilada. Imerge-se as lâminas duas vezes em hidróxido de amônio a 0,5% (água amoniacal). Em seguida as lâminas são lavadas em água corrente e destilada.

3.9 Desidratação e montagem

A desidratação das lâminas é feita através das passagens em etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos e etanol 100% duas vezes de 30 segundos cada. A montagem é feita com Entellan neu (Merck, cód #1.07961, Alemanha) e lamínulas.

3.10 Avaliação imunohistoquímica

Os cortes dos níveis de 2 a 10 do TMA foram testados por método imunohistoquímico com relação à reatividade para as citoqueratinas de alto peso molecular CK5, CK14, de baixo peso molecular CK18, CK8, receptor de estrógeno e para Par-4, NdrG1, Osteonectina e Pontina. A avaliação dos resultados obtidos nas reações foi feita de forma quantitativa, através do sistema de análise automatizada de imagem ACIS III, da Dako. As proteínas codificadas pelos genes RUVBL1, NDRG1 e SPARC foram avaliadas quanto à sua expressão citoplasmática. A proteína codificada pelo PAR-4 foi avaliada quanto a sua expressão citoplasmática e nuclear. A reação imunohistoquímica foi considerada positiva para Par-4, Pontina, ndrg1 e sparc na ocorrência de precipitação de pigmento castanho em intensidade semelhante à observada nos controles positivos realizados em tecidos que expressam estas proteínas. Em cada fragmento do TMA foram feitas cinco medidas, após calibração das áreas azuis (negativas) e castanhas (positivas), para cada uma das proteínas estudadas. A área negativa, a área corada em castanho e a intensidade da coloração castanha foram parâmetros obtidos pelo ACISIII TMA Application Software, em seguida exportados para uma planilha de Excel, a partir de onde um escore foi calculado para cada medida, utilizando-se a fórmula abaixo,

$$Escore = \frac{i.ac}{ac + az},$$

onde *i* é intensidade de coloração, *ac* área castanha, *az* área azul

Para cada fragmento do TMA, o resultado final foi obtido pela soma aritmética dos valores de escore obtidos dividida pelo número de medidas realizadas.

3.11 Avaliação estatística

Inicialmente efetuou-se a análise descritiva das variáveis do estudo. Os resultados foram apresentados em tabelas de frequências para as variáveis qualitativas. No que tange às variáveis quantitativas, foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão.

Para comparar os valores de expressão das quatro proteínas (ndrg1, osteonectina, Par-4 e pontina) quanto às classes diagnósticas presentes no *Tissue Microarray* (TMA) foi utilizado inicialmente o teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar se as variáveis descritivas contínuas tem, ou não, distribuição normal e desta forma verificar o teste adequado a ser aplicado (Kirkwood e Sterne 2003). Em seguida, empregou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para comparação das medianas (Siegel et al. 2006). Em caso de diferença com significância estatística entre as classes, utilizou-se o teste não paramétrico de Dunn para identificação da(s) classe(s) distinta(s) das demais (Neter et al. 1996).

Em seguida foram realizados testes de correlação de Spearman entre os valores de expressão das quatro proteínas analisadas e, também, entre estas e os valores do receptor de estrógeno.

Para realização dos testes estatísticos considerou-se o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

No período compreendido entre janeiro de 2005 e maio de 2006 foram realizados 797 procedimentos cirúrgicos para exérese de lesões mamárias no Hospital Pérola Byington, no Município de São Paulo, cujos laudos anatomopatológicos foram avaliados em busca de lesões proliferativas. Desse total, obtiveram-se 90 pacientes com material anatomopatológico cirúrgico adequado ao presente estudo.

Os resultados aqui apresentados provêm da avaliação do material de um subgrupo das noventa pacientes inicialmente selecionadas, cujos blocos continham material suficiente para confecção de um TMA, que foi construído com 84 fragmentos provenientes de 28 pacientes. Após exclusão das amostras com parênquima mamário, tecido fibroadiposo ou fragmentos que continham menos de 50% de sua área representada pela lesão de interesse, restaram 68 lesões de 26 pacientes que tinham, em média, 49,9 anos ($dp=9,7$ anos), variando de 32 a 75 anos. A maioria delas (61,1%) tinha pele de cor branca ($n=18$) e teve mais de uma lesão proliferativa representada no TMA (80,8%) (Tabela 4).

Os fragmentos presentes no TMA foram testados para a expressão imunohistoquímica de NDRG1, PAR-4, SPARC e RUVBL1. Para caracterização do tipo de lesões presentes no TMA, foram também usados anticorpos para citoqueratinas de alto e baixo peso molecular e para o receptor de estrógeno (ER), respectivamente nos níveis 2, 3, 4, 5 e 6 do TMA.

Para finalidade de análise estatística, os casos de adenose esclerosante e adenose nodular foram agrupados na classificação “adenose”. Os casos de alteração

colunar e alteração colunar atípica foram agrupados na classificação “alteração colunar”.

Tabela 4: Distribuição das pacientes amostradas no TMA, segundo número final de lesões proliferativas avaliadas por paciente. Hospital Pérola Byington, São Paulo, 2005/2006

Nº de lesões	Nº de pacientes (%)
1	5 (19,2)
2	11 (42,3)
3	2(7,7)
4	5 (19,2)
5	1 (3,8)
6	2 (7,7)
Total	26 (100)

4.1 Expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno

A marcação imunohistoquímica para o receptor de estrógeno ocorreu em todas as lesões avaliadas no TMA, com precipitação nuclear do cromógeno, excetuados os casos de metaplasia apócrina, que não expressaram o receptor de estrógeno. Um caso apresentou aspectos morfológicos de transição entre metaplasia apócrina e alteração colunar e exibiu expressão de receptor estrógeno. As figuras 4 e 5 contém exemplos ilustrativos da marcação para o receptor de estrógeno em lesões do TMA. Nas figuras 5C, 5D, 5E e 5F observam-se exemplos do padrão observado para o receptor de estrógeno em metaplasia apócrina. Os valores obtidos para a

expressão do receptor de estrógeno nas diversas classes de lesões presentes no TMA estão descritos na figura 6.

A comparação múltipla, pelo método não paramétrico de Dunn evidenciou diferença significativa quanto à expressão de estrógeno entre adenose e alteração colunar ($p=0,024$), adenose e papiloma ($p<0,001$), adenose e papiloma de pequenos ductos ($p=0,006$) e adenose e hiperplasia epitelial ($p=0,006$). Observou-se ainda diferença estatística entre papiloma de pequenos ductos e adenose apócrina ($p=0,003$) e entre papiloma de pequenos ductos e papiloma ($p=0,045$), conforme tabela 5.

Figura 4: Elementos ilustrativos da expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno em adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA

A: adenose apócrina 10X B: adenose apócrina 20X C: adenose esclerosante 10X D: adenose esclerosante 20X E: alteração colunar 10X F: alteração colunar 20X

Figura 5: Elementos ilustrativos da expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno em hiperplasia epitelial, metaplasia apócrina e papilomatose de pequenos ductos presentes no TMA

A: Hiperplasia epitelial 10X B: Hiperplasia epitelial 20X C: Papiloma de pequenos ductos 10X. Note área de metaplasia apócrina associada às 6 horas. D: Papiloma de pequenos ductos 20X com ênfase na área de metaplasia apócrina. E: Papiloma de pequenos ductos acima e à direita 10X. À esquerda metaplasia apócrina. F: Maior aumento (20X) de detalhe da figura E: papiloma de pequenos ductos à direita e metaplasia apócrina à esquerda.

Figura 6: Distribuição da expressão imunohistoquímica do receptor de estrógeno, de acordo com as classes de lesões mamárias presentes no TMA

1: adenose (n=10) ; 2: adenose apócrina (n=5); 3: alteração colunar (n=9); 4: papiloma (n=13); 5: papiloma de pequenos ductos (18); 6: hiperplasia epitelial (n=13); 7: metaplasia apócrina (n=1).

Tabela 5: Associação entre a expressão do receptor de estrógeno e lesões mamárias presentes no TMA

TMA classes diagnósticas	adenose	adenose apócrina	alteração colunar	papiloma	papiloma pequenos ductos	hiperplasia epitelial	metaplasia apócrina
adenose	1						
adenose apócrina	0,631	1					
alteração colunar	0,024	0,165	1				
papiloma	<0,001	0,003	0,076	1			
papiloma pequenos ductos	0,006	0,108	0,923	0,045	1		
hiperplasia epitelial	0,006	0,088	0,777	0,100	0,819	1	
metaplasia apócrina	0,908	0,897	0,385	0,105	0,352	0,317	1

* Comparação múltipla pelo método não paramétrico de Dunn.

4.2 Expressão imunohistoquímica das citoqueratinas

Observou-se imunexpressão citoplasmática dual das citoqueratinas de alto e baixo peso molecular, com padrão em mosaico nas hiperplasias epiteliais, adenose apócrina e adenose esclerosante, onde células marcadas pelas citoqueratinas de baixo peso molecular estavam distribuídas aleatoriamente nas lesões, em meio às células marcadas pelas citoqueratinas de alto peso molecular, conforme exemplificado na figura 7. Nos papilomas e papilomas de pequenos ductos a imunexpressão citoplasmática de citoqueratinas de alto peso molecular ocorreu em células aplainadas junto à membrana basal e, de forma dispersa, em meio às células com imunexpressão de citoqueratinas de baixo peso molecular, na porção luminal, conforme mostrado nas figuras 8A, 8B, 8C e 8D à direita. Na alteração colunar e metaplasia apócrina a imunexpressão das citoqueratinas de alto peso molecular ocorreu nas células aplainadas junto à membrana basal. As células junto à porção luminal destas lesões marcaram somente para as citoqueratinas de baixo peso molecular, conforme exemplo nas figuras 8A, 8B, 8C e 8D à esquerda e 8E, 8F, 8G e 8H.

Figura 7: Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de citoqueratinas de alto e baixo peso molecular em hiperplasia epitelial e adenose apócrina do TMA (padrão em mosaico)

A: Hiperplasia epitelial: CK5 B: Hiperplasia epitelial: CK 14 C: Hiperplasia epitelial: CK8 D: Hiperplasia epitelial: CK18 E: Adenose apócrina: CK5 F: Adenose apócrina: CK14 G: Adenose apócrina: CK8 H: Adenose apócrina: CK18
CK: citoqueratina

Figura 8: Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de citoqueratinas de alto e baixo peso molecular em papiloma de pequenos ductos, metaplasia apócrina e alteração colunar

A: metaplasia apócrina à esquerda da figura e papiloma de pequenos ductos à direita: CK5
 B: metaplasia apócrina à esquerda da figura e papiloma de pequenos ductos à direita: CK14
 C: metaplasia apócrina à esquerda da figura e papiloma de pequenos ductos à direita: CK8
 D: metaplasia apócrina à esquerda da figura e papiloma de pequenos ductos à direita: CK18
 E: alteração colunar: CK5 F: alteração colunar: CK14 G: alteração colunar: CK8 H: alteração colunar: CK18
 CK: citoqueratina

4.3 Expressão imunohistoquímica de Par-4

A expressão imunohistoquímica de Par-4 foi observada no núcleo e no citoplasma de todas as lesões presentes no TMA que puderam ser avaliadas para a proteína. No citoplasma a marcação ocorreu de forma difusa, com intensidade de fraca a moderada e a marcação nuclear foi intensa, conforme exemplos nas figuras 9 e 10. A distribuição dos valores obtidos na avaliação quantitativa da expressão nuclear e citoplasmática de Par-4 pode ser observada nas figuras 11 e 12. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as classes de lesões proliferativas mamárias presentes no TMA quanto à expressão imunohistoquímica nuclear e citoplasmática de PAR-4.

Figura 9: Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de Par-4 em amostras de adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA

A: adenose apócrina 10X B: adenose apócrina 20X C: adenose esclerosante 10X D: adenose esclerosante 20X E: alteração colunar 10X F: alteração colunar 20X. Observar em todas as fotografias a marcação nuclear e citoplasmática da proteína.

Figura 10: Elementos ilustrativos do padrão de expressão imunohistoquímica de Par-4 em amostras de hiperplasia epitelial, papiloma, papiloma de pequenos ductos e metaplasia apócrina presentes no TMA

A: hiperplasia epitelial 10X B: hiperplasia epitelial 20X C: papiloma 10X D: papiloma 20X E: metaplasia apócrina abaixo à esquerda e papiloma de pequenos ductos acima e à direita 10X F: metaplasia apócrina abaixo à esquerda e papiloma de pequenos ductos acima e à direita 20X. Observar a marcação nuclear e citoplasmática da proteína em todas as lesões.

Figura 11: Distribuição da expressão imunohistoquímica nuclear de Par-4, de acordo com as classes de lesões mamárias presentes no TMA

1: adenose (n=8); 2: adenose apócrina (n=3); 3: alteração colunar (n=7); 4: papiloma (n=13); 5: papiloma de pequenos ductos (n=18); 6: hiperplasia epitelial (n=12); metaplasia apócrina (n=1)

Figura 12: Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de Par-4, de acordo com as classes de lesões mamárias presentes no TMA

1: adenose (n=9); 2: adenose apócrina (n=5); 3: alteração colunar (n=7); papiloma (n=13); 5: papiloma de pequenos ductos (n=18); 6: hiperplasia epitelial (n=13); metaplasia apócrina (n=1)

4.4 Avaliação imunohistoquímica de osteonectina

A marcação da proteína osteonectina foi observada no citoplasma de todos os fragmentos do TMA, sob forma de coloração castanha difusa, com quantidade variável de grânulos citoplasmáticos, por vezes com nítido reforço perinuclear (figuras 13 e 14). Nas lesões com diferenciação apócrina, observou-se nítido reforço da expressão da proteína na membrana citoplasmática na porção luminal das células marcadas, conforme mostrado nas figuras 14D e 14F. À avaliação dos valores obtidos para a expressão citoplasmática da proteína osteonectina, observou-se diferença com significância estatística ($p=0,003$) entre as classes diagnósticas presentes no TMA. (Tabela 6 e Figura 15). Os resultados obtidos pela análise não paramétrica evidenciaram que as diferenças estavam nos níveis de expressão da proteína na classe diagnóstica papiloma em relação às classes adenose ($p= <0,001$), alteração colunar ($p=0,009$) e papiloma de pequenos ductos ($p=0,001$) e, também, nos valores de imunoexpressão na hiperplasia epitelial em relação aos valores das classes adenose ($p=0,004$), alteração colunar ($p=0,033$) e papiloma de pequenos ductos ($p=0,009$). Especificamente com relação à osteonectina também foi avaliada a ocorrência de marcação estromal da proteína. A precipitação do cromógeno no compartimento estromal intralesional das lesões ocorreu de forma variável e foi avaliada semiquantitativamente, como presente ou ausente. Em algumas lesões, a expressão estromal da proteína não pode ser avaliada devido à ausência de quantidade suficiente de estroma para análise no interior das lesões. Para a expressão estromal da proteína osteonectina, analisaram-se 63 lesões mamárias, das quais 43 (68,3%) exibiram precipitação do cromógeno em células estromais alongadas. Na tabela 7 encontram-se as prevalências de lesões que exibiram expressão estromal de osteonectina. Vale à pena destacar que esse desfecho ocorreu

em menos da metade das lesões nas classes diagnósticas papiloma (46,2%) e papiloma de pequenos ductos (20,0%).

Figura 13: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de osteonectina em adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA

A: adenose apócrina 10X B: adenose apócrina 20X C: adenose esclerosante 10X. D: adenose apócrina 20X. Observar marcação da proteína em células alongadas do estroma na porção superior da figura. E: alteração colunar 10X. Observar marcação da proteína em células alongadas do estroma à direita da figura, em cima e em baixo. F: alteração colunar 10X.

Figura 14: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de osteonectina em hiperplasia epitelial, papiloma de pequenos ductos e papiloma presentes no TMA

A: hiperplasia epitelial 10X B: hiperplasia epitelial 20X. Observar a marcação da proteína em células estromais alongadas à esquerda. C: papiloma de pequenos ductos 10X. D: papiloma de pequenos ductos 20X. Observar o reforço apical da proteína em área de metaplasia apócrina. E: papiloma 10X. F: papiloma 20X. Observar o reforço apical da proteína em área de metaplasia apócrina.

Figura 15: Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de Osteonectina, de acordo com as classes de lesões mamárias presentes no TMA

1: adenose (n=10); 2: adenose apócrina (n=5); 3: alteração colunar (n=8); 4: papiloma (n=13); 5: papiloma de pequenos ductos (n=18); 6: hiperplasia epitelial (n=13); 7: metaplasia apócrina (n=1)

Tabela 6: Associação entre a expressão citoplasmática de Osteonectina e lesões mamárias presentes no TMA

TMA classes diagnósticas	adenose	adenose apócrina	alteração colunar	papiloma	papiloma pequenos ductos	hiperplasia epitelial	metaplasia apócrina
adenose	1						
adenose apócrina	0,459	1					
alteração colunar	0,605	0,778	1				
papiloma	<0,001	0,055	0,009	1			
papiloma pequenos ductos	0,524	0,761	0,988	0,001	1		
hiperplasia epitelial	0,004	0,130	0,033	0,587	0,009	1	
metaplasia apócrina	0,496	0,779	0,659	0,498	0,653	0,637	1

*comparação múltipla, pelo método não paramétrico de Dunn

Tabela 7: Distribuição da imunoexpressão de osteonectina em células estromais alongadas, segundo as classes de lesões mamárias presentes no TMA

TMA classes de lesões	nº lesões analisadas	nº lesões com células do estroma + (%)
adenose	10	10 (100)
adenose apócrina	4	4 (100)
alteração colunar	9	9 (100)
papiloma	13	6 (46,2)
papiloma de pequenos ductos	15	3 (20,0)
hiperplasia epitelial	11	10 (90,9)
metaplasia apócrina	1	1 (100)
Total	63	43 (68,3)

4.5 Expressão imunohistoquímica de NDRG1

A precipitação do cromógeno foi observada no citoplasma das lesões avaliadas, sob a forma de coloração castanha difusa, de fraca a moderada intensidade ou com padrão granular, de forte intensidade, por vezes com reforço perinuclear. A marcação se deu de forma focal, restrita a áreas de diferenciação apócrina em onze fragmentos, seis com metaplasia apócrina e cinco com adenose apócrina, conforme exemplos na figura 17, de A a F. Em um dos papilomas presentes no TMA observou-se coloração de forte intensidade em área focal da amostra, com reforço perinuclear, conforme figuras 18E e 18F. Em outras doze lesões, categorizadas como hiperplasia epitelial, houve precipitação difusa e moderada do cromógeno, com grânulos e reforço perinuclear, conforme exemplo nas figuras 18A e 18B. As demais lesões presentes no TMA exibiram marcação citoplasmática difusa, com poucos grânulos em fundo castanho, com coloração de intensidade fraca a moderada, conforme exemplos nas figuras 16, 17E e 17F. Verificou-se diferença com significância estatística ($p=0,005$) para a expressão citoplasmática de NDRG1 entre as classes

diagnósticas presentes no TMA (Tabela 8 e Figura 19). A figura 19, com a distribuição dos valores segundo a média obtida na avaliação quantitativa de NDRG1, evidencia os três grupos de lesões onde foi nítida a maior expressão da proteína: metaplasia apócrina, adenose apócrina e hiperplasias epiteliais e exibe os valores obtidos para as demais classes de lesões presentes no TMA. À investigação, pelo método de comparações múltiplas de Dunn, das classes diagnósticas de lesões mamárias presentes no TMA que diferiram quanto ao nível de expressão citoplasmática de NDRG1, observou-se que os valores na adenose diferiram de forma estatisticamente significativa dos da metaplasia apócrina ($p=0,009$); os valores da alteração colunar diferiram de forma estatisticamente significativa dos da adenose apócrina ($p=0,017$), da hiperplasia epitelial ($p=0,010$) e da metaplasia apócrina ($p=0,001$); os valores do papiloma de pequenos ductos diferiram de forma estatisticamente significativa dos valores da adenose apócrina ($p=0,037$), da hiperplasia epitelial ($p=0,024$) e da metaplasia apócrina ($p=0,002$) (Tabela 8).

Figura 16: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de NDRG1 em adenose esclerosante, alteração colunar, papiloma e papiloma de pequenos presentes no TMA

A: adenose esclerosante 10X; B: alteração colunar 10X; C: alteração colunar 10X; D: papiloma 10X; E: papiloma de pequenos ductos 10X; F: papiloma de pequenos ductos 10X.

Figura 17: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de NDRG1 em adenose apócrina, alteração colunar, metaplasia apócrina e papiloma de pequenos ductos presentes no TMA

A: adenose apócrina 10X B: adenose apócrina 20X C: abaixo da figura: área de transição metaplasia apócrina à esquerda / alteração colunar à direita da figura 10X D: área de transição metaplasia apócrina à esquerda / alteração colunar à direita 20X. Observar marcação intensa da proteína à esquerda. E: metaplasia apócrina à esquerda da figura, papiloma de pequenos ductos à direita 10X F: metaplasia apócrina à esquerda da figura, papiloma de pequenos ductos à direita 20X. Observar a marcação intensa da proteína à esquerda, na área de metaplasia apócrina.

Figura 18: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de NDRG1 em hiperplasia epitelial, papiloma e papiloma de pequenos ductos presentes no TMA

A: hiperplasia epitelial 10X; B: hiperplasia epitelial 40X. Observar grânulos e reforço perinuclear da marcação da proteína; C: papiloma de pequenos ductos 10X. Abaixo às 6 horas área de metaplasia apócrina; D: papiloma de pequenos ductos. Detalhe da área de metaplasia apócrina da lesão; E: papiloma com área de atipia delimitada pela precipitação de NDRG1 F: papiloma com área de atipia 20X. Detalhe da área marcada em E. Observar reforço perinuclear de NDRG1.

Figura 19: Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de NDRG1, de acordo com as classes de lesões mamárias presentes no TMA

1: adenose (n=9); 2: adenose apócrina (n=5); 3: alteração colunar (n=10); 4: papiloma (n=12); 5: papiloma de pequenos ductos (n=14); 6: hiperplasia epitelial (n=12); metaplasia apócrina (n=6)

Tabela 8: Associação entre a expressão de NDRG1 e lesões mamárias presentes no TMA

TMA classes diagnósticas	adenose	adenose apócrina	alteração colunar	papiloma	papiloma pequenos ductos	hiperplasia epitelial	metaplasia apócrina
adenose	1						
adenose apócrina	0,079	1					
alteração colunar	0,472	0,017	1				
papiloma	0,312	0,315	0,070	1			
papiloma pequenos ductos	0,804	0,037	0,588	0,160	1		
hiperplasia epitelial	0,077	0,706	0,010	0,414	0,024	1	
metaplasia apócrina	0,009	0,516	0,001	0,063	0,002	0,234	1

*comparação múltipla pelo método não paramétrico de Dunn,

4.6 Expressão imunohistoquímica de Pontina

A expressão imunohistoquímica de Pontina ocorreu de forma intensa e difusa em todas as lesões estudadas, sob a forma de fundo castanho intenso na maior parte das lesões, por vezes com grânulos intracitoplasmáticos agrupados, conforme exemplos nas figuras 20 e 21. A figura 22 mostra a distribuição dos valores segundo a média obtida na avaliação quantitativa da expressão da proteína. Observou-se diferença estatisticamente significativa nos valores de expressão de Pontina entre as classes diagnósticas hiperplasia epitelial em relação à adenose ($p=0,048$), adenose apócrina ($p=0,012$), alteração colunar ($p=0,015$) e papiloma de pequenos ductos ($p=0,012$), conforme tabela 9.

Figura 20: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de Pontina em adenose apócrina, adenose esclerosante e alteração colunar presentes no TMA

A: adenose apócrina 10X; B: adenose apócrina 20X, C: adenose esclerosante 10X; D: adenose esclerosante 20X E: alteração colunar 10X; F: alteração colunar 20X

Figura 21: Elementos ilustrativos de expressão imunohistoquímica de Pontina em hiperplasia epitelial, papiloma e papiloma de pequenos ductos presentes no TMA

A: hiperplasia epitelial 10X; B: hiperplasia epitelial 20X; C: papiloma 10X D: papiloma 20X; E: metaplasia apócrina abaixo à esquerda e papiloma de pequenos ductos à direita da figura 10X; F: metaplasia apócrina abaixo à esquerda e papiloma de pequenos ductos à direita da figura 20X.

Figura 22: Distribuição da expressão imunohistoquímica citoplasmática de Pontina, de acordo com as classes de lesões mamárias presentes no TMA

1: adenose (n=9); 2: adenose apócrina (n=5); 3: alteração colunar (n=8); 4: papiloma (n=13); 5: papiloma de pequenos ductos (n=18); 6: hiperplasia epitelial (n=13) 7: metaplasia apócrina (n=1)

Tabela 9: Associação entre a expressão de Pontina e lesões mamárias presentes no TMA

TMA Classes diagnósticas	adenose	adenose apócrina	alteração colunar	papiloma	papiloma pequenos ductos	hiperplasia epitelial	metaplasia apócrina
adenose	1						
adenose apócrina	0,398	1					
alteração colunar	0,634	0,674	1				
papiloma	0,211	0,054	0,085	1			
papiloma pequenos ductos	0,893	0,410	0,678	0,101	1		
hiperplasia epitelial	0,048	0,012	0,015	0,420	0,012	1	
metaplasia apócrina	0,572	0,909	0,731	0,273	0,598	0,161	1

*comparação múltipla pelo método não paramétrico de Dunn.

5. DISCUSSÃO

As proteínas *ndrg1*, osteonectina, par-4 e pontina previamente identificadas por nosso grupo como diferencialmente expressas em carcinomas mamários humanos e linhagens celulares de carcinoma de mama forneceram dados de interesse, a maior parte deles inéditos. No caso de NDRG1, observamos valores diferenciados da expressão citoplasmática da proteína nas diferentes classes de lesões mamárias estudadas no TMA, com significância estatística para estes valores ($p=0,005$). Lesões mamárias com diferenciação apócrina, representadas no estudo por seis amostras de metaplasia apócrina e por cinco amostras de adenose apócrina, caracterizaram-se por altos valores de expressão de NDRG1. A observação feita por nós, da presença de alta expressão de NDRG1 em lesões apócrinas no tecido mamário, fornece subsídios para o postulado que coloca a origem mamária desta célula e sugere que este fenótipo ocorra devido à expressão diferenciada de NDRG1. A origem e função da célula apócrina na glândula mamária é motivo de debate na literatura. Teorias para a origem destas células incluem fenômeno metaplásico ou degenerativo em células mamárias ou sequestro de glândulas apócrinas exógenas durante o processo de desenvolvimento mamário. O encontro destas células na mama já em fetos de todas as idades gestacionais e seu aumento em número durante o desenvolvimento do parênquima mamário aponta para a origem mamária da célula apócrina (Viacava et al. 1997), fato este em concordância com as observações de nosso trabalho. Nossos dados também são consistentes com os obtidos por Farmer et al. (2005), que procederam à análise de expressão gênica através de c-DNA *microarray* em 49 carcinomas de mama e identificaram um grupo de tumores por

eles denominado como “apócrino molecular”, caracterizado pelo fenótipo histológico apócrino, por não expressar receptor de estrógeno e por apresentar a via de sinalização de andrógenos ativada. Neste trabalho Farmer et al. (2005) apontam NDRG1 entre os genes diferencialmente expressos na assinatura molecular grupo apócrino dos carcinomas de mama.

Outra observação de valia é a da hiperexpressão de NDRG1 em lesões proliferativas do parênquima mamário. Não temos subsídios para propor mecanismos pelos quais ocorra a hiperexpressão do NDRG1 nestas lesões, mas podemos supor que a hiperexpressão da proteína esteja ligada à amplificação de genes do cromossomo 8q, frequentemente observada no carcinoma invasivo da mama. Ganhos no cromossomo 8q foram também observados em carcinomas *in situ*, considerados precursores do carcinoma invasivo, e estas alterações figuram entre as modificações genéticas propostas por Buerger et al. (2001) como iniciais na carcinogênese mamária, estando presentes tanto na “via de baixo grau” como na “via de alto grau”, no modelo de progressão do câncer de mama proposto pelos autores (figura 3).

Nossa observação da hiperexpressão de NDRG1 em lesões proliferativas mamárias é congruente com o estudo de Redmond et al. (2010), que aponta NDRG1 como um gene com importante papel no controle da proliferação celular no parênquima mamário e com as observações de Klawitter et al. (2010) que obteve NDRG1 como um dos genes hiporegulados em células tratadas pela lovastatina, um agente redutor de colesterol com funções pleiotrópicas, incluindo redução dos sinais que dirigem as respostas de proliferação e sobrevivência celular em alguns trabalhos experimentais, inclusive no câncer de mama. Tomadas em conjunto com as observações de Nagai et al. (2010a) sobre a hiperexpressão do NDRG1 em carcinomas mamários com pior prognóstico, nossos dados apontam a expressão do

NDRG1 como possivelmente alterada já na fase inicial da carcinogênese mamária, em tese representada pelas lesões proliferativas da mama.

NDRG1 em carcinomas de mama que não expressam receptor de estrógeno é aparentemente regulado por receptores de andrógeno (Farmer et al. 2005). Em tumores de mama e em linhagens celulares de tumores de carcinoma de mama que expressam receptor de estrógeno, NDRG1 é reprimido pelo estrógeno (Fotovati et al. 2004). Alguns tumores do subtipo luminal A do carcinoma de mama, assim classificados pela expressão do receptor de estrógeno e ativação da via estrogênica, apresentam também ativação da via androgênica (Farmer et al. 2005) e expressam NDRG1 (Nagai et al. 2010a). Estes tumores do subtipo luminal A que expressam NDRG1 têm também características em comum com o subtipo HER-2, e embora não apresentem amplificação de HER-2, expressam genes do amplicon 17q, ao qual pertence HER-2 (Farmer et al. 2005). Farmer et al. (2005), postulam que a expressão concomitante de ER e AR em carcinomas de mama não determina o fenótipo apócrino devido à sinalização estrogênica dominante nestas células. Em carcinomas onde não há a expressão do receptor de estrógeno, a diferenciação apócrina dar-se-ia através da estabilização do receptor de andrógeno pelo HER-2.

Já é conhecido na literatura que o receptor de estrógeno está hiporegulado e que o receptor de andrógeno está hiperexpresso nas lesões apócrinas de mama (Wells e El-Ayat 2007, Massod e Rosa 2009), sendo que Wells e El-Ayat (2007) propõem uma ação androgênica para a morfogênese destas lesões no parênquima mamário. O nosso achado de hiperexpressão de NDRG1 sugere a possibilidade de que as lesões proliferativas mamárias além de expressar o receptor de estrógeno também expressem receptor de andrógeno e tenham a via de andrógenos ativa. Jensen et al. (2008) observaram expressão diferenciada de FASN (*fatty acid synthase*) em casos

de metaplasia apócrina, alteração colunar e alteração colunar com atipia. FASN tem elementos de resposta ao andrógeno e exibe expressão diferenciada em tumores mamários com atividade de transcrição androgênica, assim como NDRG1 (Doane et al. 2006). FASN e NDRG1 têm muitos membros de seu interatoma regulados por andrógenos e NDRG1 se liga à via dos andrógenos mediante sua interação com β catenina e Hsp90 (Lan et al. 2007). Hsp90 e outras proteínas reguladas por andrógenos foram identificadas na análise do perfil proteômico do fluido e de células de revestimento de cistos apócrinos de mama (Celis et al. 2006). Com base nas observações quanto à ativação das vias de sinalização de estrógenos e andrógenos em carcinomas de mama (Farmer et al. 2005) e no fato acima referido sobre a negatividade do receptor de estrógenos em lesões apócrinas benignas das mamas, poder-se-ia especular que a expressão dos receptores de andrógeno com consequente ativação de suas vias, na ausência da expressão de receptor de estrógeno, resultaria na diferenciação apócrina das células mamárias. Por outro lado, a co-expressão dos receptores estrogênicos e androgênicos resultaria em expressão do NDRG1 e um estado de hiperproliferação das células mamárias, conforme observado por Farmer et al. (2005) nos carcinomas luminais A com via androgênica ativa. É possível conjecturar um papel do HER-2 no balanço das funções de diferenciação, no caso apócrina, e de proliferação celular, aparentemente promovidas pelo NDRG1 em células mamárias, levando em conta relatos na literatura sobre a super-expressão de HER-2 em lesões apócrinas da mama (Selim 2000) e a superexpressão de HER-2 no subtipo “molecular apócrino” do câncer mamário, definido por perfis de expressão gênica em larga escala em carcinomas de mama (Farmer et al. 2005, Sanga et al. 2009, Vranic et al. 2010). A inter-relação observada entre a via do receptor de andrógenos e do HER-2, com efeito na proliferação celular, em modelo experimental

do carcinoma apócrino de mama (Naderi e Hughes-Davies 2008) e o encontro de associação entre expressão de NDRG1 e HER-2 por Nagai et al. (2010a) também são argumentos a favor de nossa proposição.

É sabido que o estrógeno tem papel significativo no desenvolvimento e progressão do câncer de mama e os mais fortes fatores epidemiológicos de risco para o desenvolvimento de carcinoma mamário podem ser explicados em termos de uma exposição prolongada ao hormônio durante o período de vida da mulher. O papel dos andrógenos no desenvolvimento do câncer de mama, por outro lado, é pouco conhecido. Nossas observações sugerem uma possível atuação dos androgênios nas lesões hiperproliferativas mamárias, inferido a partir da nossa observação de hiperexpressão de NDRG1 em lesões hiperplásicas desta glândula. Também corroboram esta hipótese os achados de Celis et al. (2006) sobre o perfil proteômico dos cistos apócrinos de mama, que é eminentemente representado por genes regulados por andrógenos.

A proteína Pontina teve expressão diferenciada em lesões hiperplásicas da mama, tendo sido capaz de diferenciar, de forma estatisticamente significativa, este tipo de alteração dos demais grupos de lesões mamárias presentes no TMA. Levando em conta que as lesões hiperplásicas da mama são tidas por alguns autores como precursores putativos do carcinoma de mama, esta observação é consistente com a referida ação da expressão de Pontina na transformação celular mediada por Myc (revisão em Gallant 2007, Jha e Dutta 2009).

A expressão do gene MYC é altamente influenciada por sinais mitogênicos e este gene quando expresso de forma desregulada atua como um oncogene. Na transformação neoplásica, o fator de transcrição Myc está entre os mais frequentemente alterados. Myc reprime *p21*, um inibidor do ciclo celular através de

ação em quinases ciclina-dependentes. Pontina se associa e coopera com o complexo Myc/Miz na inibição do *p21* (revisão em Gallant 2007, Jha e Dutta 2009). De forma inversa, a observação da expressão de proteína com papel na transformação celular em lesões hiperplásicas da mama sugere que estas lesões possam representar estágio inicial da carcinogênese mamária.

Nossas observações com relação especificamente à ação da expressão de pontina na proliferação mamária são corroborados por Junling et al (2010), que observaram pontina como atuante na proliferação celular mediada por Myc em células mamárias *in vitro*. No estudo de Junling et al. (2010) o estímulo à proliferação celular se deu através da repressão de C/EBP ζ pelo Myc em colaboração com pontina. Interessante observar que C/EBP ζ (CCAAT/Enhancer Binding Protein ζ) é induzido durante o período de quiescência em células mamárias e reprimido durante o período proliferativo do ciclo celular. *In vivo* camundongos nulíparos C/EBP ζ -/- exibem hiperplasia mamária (Gigliotti et al. 2003) e este gene foi um dos obtidos por Porter et (2001) como progressivamente hiporegulados na transição de tecido mamário normal a carcinoma *in situ* da mama, assegurando nossos achados com relação à Pontina, ainda que de uma forma indireta.

A ação apoptótica de Par-4 envolve a ativação da via de apoptose através de Fas e FasL no citoplasma ou se dá pela inibição dos estímulos de sobrevivência celular (El Guendy et. al 2003, Donniger et al. 2010). A inibição da sobrevivência celular por Par-4 ocorre pela hiporegulação da via do NF- κ B, após a translocação de Par-4 para o núcleo (Gurumurthy et al 2005). Além das ações acima referidas, Par-4 tem função supressora de tumor, atuando na via de Ras (Donniger et al. 2010). As ações da proteína são estreitamente reguladas pela sua localização citoplasmática ou nuclear. Acredita-se que a translocação nuclear de Par-4 ocorra somente em células

neoplásicas e que a passagem da proteína do citoplasma ao núcleo nestas células se dá pela sua fosforilação em resíduo específico, pela proteína quinase A (PKA) (Gurumurthy et al. 2005; Sharestha – Bahattarai e Rangnekar 2010). Postula-se que a entrada de Par-4 no núcleo de células normais e transformadas não dê devido à ausência de fosforilação do resíduo T155, devido aos baixos níveis de proteína quinase A (PKA) presente nestas células, ao contrário do observado em células cancerosas insensíveis a estímulo hormonal (Gurumurthy et al. 2005). Em nosso estudo observamos a expressão nuclear e citoplasmática de Par-4 em todas as lesões estudadas, sendo que os valores de expressão nuclear da proteína foram superiores aos valores obtidos para a expressão citoplasmática. Não temos subsídios de literatura ou condições de explicar no nosso estudo, os fatores moleculares envolvidos na translocação nuclear de Par-4 observada por nós em tecido mamário não neoplásico. Nosso trabalho, no entanto, ofereceu como importante contribuição a indicação da necessidade de novos estudos experimentais e clínicos para esclarecimento da função de Par-4 em tecido normal e hiperplásico na mama.

Com relação à Osteonectina, os resultados obtidos em nosso estudo pela análise não paramétrica evidenciaram valores diferenciados da expressão da proteína nos papilomas em relação à adenose, alteração colunar e papiloma de pequenos ductos. De forma análoga, os papilomas se diferenciam em bases patológicas da adenose, alteração colunar e papiloma de pequenos ductos. Os papilomas se desenvolvem centralmente no parênquima da mama, no epitélio de revestimentos dos ductos mamários e tendem a ocorrer em faixa etária mais avançada. Os papilomas de pequenos ductos se localizam periféricamente, tendem a ocorrer em média, em pacientes mais jovens e como a adenose e a alteração colunar, se desenvolvem nas unidades ducto-lobulares terminais (Rosen 1997, Boecker 2006, O'Malley e Pinder

2006). Na análise semiquantitativa da expressão de Osteonectina em células estromais, observamos uma expressão menos frequente da proteína nos papilomas e papilomas de pequenos ductos, aparentemente indicando, no caso dos papilomas, uma relação inversa entre a expressão citoplasmática e estromal da proteína. De forma geral, observamos uma menor frequência de expressão estromal da proteína em lesões com arquitetura papilífera. Estes achados sugerem que a expressão da proteína possa estar associada à recapitulação da organização lobular morfollogicamente observada na adenose e alteração colunar, ao contrário do que ocorre nas lesões papilíferas da mama. Nossa observação sobre a expressão diferenciada de Osteonectina na hiperplasia epitelial em relação à adenose, alteração colunar e papiloma de pequenos ductos está de acordo com os aspectos epidemiológicos e morfológicos diferenciados desta lesão, quando comparados às demais lesões benignas da mama (Page et al. 1978 e 1985). É digna de nota a observação da aparente associação entre a expressão de Osteonectina e NDRG1 em nosso estudo. Esta associação está relacionada à clara demarcação das áreas apócrinas pela Osteonectina nas amostras estudadas, sob a forma de nítido reforço na precipitação do cromógeno na membrana citoplasmática na borda luminal das células marcadas pela proteína. O reforço de expressão na membrana citoplasmática de Osteonectina que ocorreu em todas as áreas apócrinas coincidentemente com expressão de NDRG1, pode ser observado nos exemplos selecionados nas figuras 14D, 14F e 18D. Co-regulação dos genes NDRG1 e SPARC foi evidenciada por dados de nosso grupo, que mostram que os transcritos desses dois genes são regulados negativamente por EGF em células de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231 (dados ainda não publicados). Por outro lado, Nagai et al. (2010a) documentaram a hiporegulação de SPARC como associada ao reforço do pior prognóstico das pacientes com carcinoma de mama que expressam NDRG1.

Embora não tenhamos condições, no presente trabalho, de avaliar a natureza funcional da interação entre Osteonectina e NDRG1, a observação de uma possível cooperação entre os dois genes é interessante objeto de estudo para futuras investigações da regulação de expressão gênica na fisiologia do tecido mamário.

6. CONCLUSÕES

- Altos níveis da proteína NDRG1 foram observados nas lesões mamárias com diferenciação apócrina, sugerindo um possível papel deste gene no estabelecimento do fenótipo apócrino nesta glândula.

- Nossos dados indicam uma possível ação coordenada entre NDRG1 e SPARC na diferenciação apócrina do parênquima mamário.

- Lesões proliferativas mamárias apresentam hiperexpressão citoplasmática de NDRG1, embora não tenhamos subsídios para propor mecanismos pelos quais ocorra esta hiperexpressão.

- Na avaliação semiquantitativa, a expressão estromal de Osteonectina foi menos frequente em lesões mamárias com arquitetura papilífera, quando comparadas a lesões mamárias com arquitetura lobular.

- Lesões benignas da mama apresentaram a proteína Par-4 localizada no núcleo, esta observação é inédita na literatura. Nossos achados fornecem pela primeira vez evidências de que PAR-4 pode estar ativado em lesões proliferativas da mama, indicando a necessidade de estudos futuros dirigidos à investigação das funções de PAR-4 em tecido mamário não neoplásico.

- Expressão imunohistoquímica da proteína Pontina ocorreu no citoplasma das lesões avaliadas de forma intensa. Pontina foi a única proteína, entre as demais avaliadas no estudo, a apresentar expressão diferenciada em lesões hiperplásicas da mama, tendo sido capaz de diferenciar, de forma

estatisticamente significativa, este tipo de alteração dos demais grupos de lesões mamárias presentes no TMA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SAW. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr-Related Cancer* 2001;8:47-61.
2. Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, Piquemal D, Commes T, Watanabe M, Gross SC, Ying W, Ran S, Watanabe K. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene* 2004;23:5675-81.
3. Boecker W, Buerger H, Schmitz K, Ellis IA, van Diest PJ, Sinn H-P, Gerardts J, Diallo R, Poremba C, Hermann H. Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular weight cytokeratin expression patterns. *J. Pathol* 2001;195:415-21.
4. Boecker W. Preneoplasia of the breast. A new conceptual approach to proliferative breast disease. Munich: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2006.
5. Boghaert ER, Sellis SF, Walid AJ, Malone P, Williams NM, Weinstein MH, Strang R, Rangnekar VM. Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Different* 1997; 8:881-90.
6. Brasil. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=comentarios.asp&ID=13>
7. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schäffer K-L, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Different genetic pathways in the evolution of breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol.* 1999;189:521-26.

8. Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Simon R, Diallo R, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, van Diest P, Boecker W. Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* 2001;194:165–70.
9. Cangul H, Salnikow K, Yee H, Zagzag D, Commes T, Costa M. Enhanced overexpression of na HIF-1/ hypoxia related protein in cancer cells. *Environ Heath Perspect* 2002;110(suppl.5):783-88.
10. Celis JE, Gromorov P, Moreira JMA, Cabezón T, Friist E, Vejborg IMM. Proess G, rank F, Gromova I. Apocrine cysts of the breast. Biomarkers, origin, enlargement and relation with cancer phenotype. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5:462-83.
11. de Longueville F, Lacroix M, Barbuto AM, Bertholet V, Gallo D, Larsimont D, Marq L, Zammattéo N, Boffe S, Leclercq G, Remacle. J. Molecular characterization of breast cancer cell lines by low-density microarray. *Int J Oncol* 2005;27:881-92.
12. Doane AS, Danso M, Lal P, Zhang L, Hudis C, Gerald WS. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*. 2006;25:3994-08.
13. Donninger H, Hesson I, Vos M, Beebe K, Gordon L, Sidransky M, Jun WL, Schlegel T, Payne S, Hardtmann A, Latif F, Clark GJ. The effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor. *Mol Cell Biol*. doi:10.1128/MCB00208-9.
14. dos Santos ML, Palanch CG, Salaorni S, da Silva Junior WR, Nagai MA. Transcriptome characterization of human mammary cell lines expressing different levels of ERBB2 by serial analysis of gene expression. *Int J Oncol*. 2006;28:1441-61.
15. Duffy MJ. Estrogen receptors: its role in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43:325-47.

16. El-Guendy N, Yanming Z, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a unique core domains of Par-4 sufficient for selective apoptosis in cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5516-25.
17. Ellen TP, Qindong K, Ping Z, Costa M. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis* 2008;29:2-8.
18. Ellis IO. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and biology. *Mod Pathol.* 2010; 23:S1–7.
19. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, Goldstein D, Duss S, Nicoulaz A-L, Brisken C, Fiche M, Delorenzi M, Iggor R. Identification of apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* 2005;24:4660-71.
20. Fotovati A, Fujii T, Yamaguchi M, Kage M, Shirouzu K, Oie S, Basaki Y, Ono M, Yamana H, Kuwano M. 17 β estradiol induces down-regulation of Cap43/NDRG1/Drg1, a putative differentiation-related and metastasis suppressor gene in human breast cancer. *Clin Can Res* 2006;12:3010-18.
21. Freidländer E, Barok M, Szöllösi J, Vereb G. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol lett.* 2007;116:126-40.
22. Gallant P. Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol.* doi.10.1016/j.tcb.2007.02.005.
23. Garcia-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Martín-Caballero J, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M. Tumor-suppression activity of the proapoptotic regulator Par-4. *EMBO reports* 2005;6:577-83.
24. Gerhardt R, Nonogaki S, Fregnani JHTG, Soares FA, Nagai MA. NDRG1 protein overexpression in malignant thyroid neoplasm. *Clinics* 2010;65:757-62.

25. Gigliotti AP, Johnson PF, Sterneck E, DeWille JW. Nulliparous CCAAT/enhancer binding protein delta(C/EBPdelta) knockout mice exhibit mammary gland ductal hyperplasia. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003; 228:278-85.
26. Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005;25:1146-61.
27. Iqbal M, Davies MPA, Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Sloane JP. Subgroups of non-atypical hyperplasia of the breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *J Pathol* 2001;193:333-38
28. Jensen KC, Schaeffer DF, Cheang M, Montgomery K, West RB, Gilks CB, Ross D, Turashvili G, Schnitt S, van de Rijn M. Characterization of novel anti-fatty acid synthase (FASN) antiserum in breast tissue. *Mod Pathol*. 2008;21:1413-20.
29. Jha S, Dutta A. RVB1/RUB2: Running rings around molecular biology. *Mol Cell*. 2009;34:521-31.
30. Jian Z, Suning G, Wei Z, Xinping L, Honglei C, Weizhong W. Human differentiation-related gene NDRG1 is a Myc downstream-regulated gene that is repressed by Myc on the core promoter region. *Gene* 2008;417:5-12
31. Jiawei C, Shuxia L, Zhaorui Y, Guangzhong L, Honghui H. Correlation between NDRG1 and PTEN expression in endometrial carcinoma. *Cancer Sci* 2008, 99: 706-10.
32. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, Dexter T, Davies S, Bulmer K, Ford E, Parry S, Budioni M, Palmieri G, Neville AM, O'Hare MJ, Lakhani SR. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64:3037-45.

33. Junling S, Xueyan Yu, Yingjie Z, DeWille JW. Myc interacts with Max and Miz1 to repress C/EBP ζ promoter activity and gene expression. *Mol Cancer*. 2010;9:92-106.
34. Kewei J, Zhanlong S, Yingjiang Y, Xiaododong Y, Shan W. A novel molecular marker for early detection and evaluating prognosis of gastric cancer: N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1). *Scand J Gastroenterol*. 2010;45:898-908.
35. Klawitter J, Shokati T, Moll V, Klawitter J. Effects of lovastatin on breast cancer cells: a proteo-metabonomic study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;12:R16 (<http://breast-cancer-research.com/content/12/2/R16>)
36. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential Medical Statistics*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2003.
37. Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 2008;27:6120-30.
38. Lachat P, Shaw P, Gebhard, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochem Cell Biol*. 2002;118:399-408.
39. Lan CT, Xiawei Y, Hood L, Biaoyang L. Proteomics analysis of the interactome of N-myc downstream regulated gene 1 and its interactions with the androgen response program in prostatic cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:575-88.
40. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 2010;57:171-92.
41. Mackay A, Jones C, Dexter T, Silva RLA, Bulmer K, Jones A, Simpson D, Harris RA, Jat PS, Neville AM, Reis LFL, Lakhani SR, O'Hare MJ. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu)

overexpression in human mammary luminal epithelial breast cells. *Oncogene* 2003;22:2680-88.

42. Massood S, Rosa M. The challenge of apocrine proliferations of the breast: a morphologic approach. *Pathol, Res Pract* 2009;205:155-64.
43. Medina D. Mammary developmental fate and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:483-95.
44. Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen negative breast cancer.
45. Nagai MA, Brentani MM. Gene expression profiles in breast cancer to identify estrogen receptor target genes. *Mini-Rev Med Chem.* 2008;8:448-54.
46. Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JHTG, Nonogaki S, Rierger RB, Mourão Netto M, Soares FA. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010a *doi*
47. Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, Fregnani JHTG, Nonogaki S, Mourão Netto, Soares FA. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. *Int J Oncol.* 2010b;37:41-9.
48. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models.* 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing, 1996.
49. O'Connell P, Pekkel W, Fuqua SAW, Osborne CK, Clark GM, Allred DG. Analysis of loss of heterozygosity in 399 breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:697-03.
50. O'Malley FP, Pinder SE. *Breast Pathology.* Philadelphia. Elsevier Inc; 2006.
51. Page DL, VanderZwaag R, Rogers LW, Williams LT, Walker WE, Hartmann WH. Component parts of fibrocystic disease complex and breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1978;61: 1055-63.

52. Page DL, Dupont DW, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long term follow-up study. *Cancer* 1985;55:2698-08.
53. Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR, Riggins G, Polyak K. A SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 2001;61:5697-5702.
54. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nature Med* 2009;15:842-44.
55. Ranganathan P, Rangnekar WM. Regulation of cancer cell survival by Par-4. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1059:76-85.
56. Redmond KL, Crawford NT, Farmer H, D'Costa ZC, O'Brien GJ, Buckley NE, Kennedy RD, Johnston PG, Harkin DP, Mullan PB. T-Box2 represses NDRG1 through an EGR1 dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* 2010;29:3252-62.
57. Rosen PP. Rosen's breast pathology. 2nd. Ed. Philadelphia. Lippincott-Raven; 1996.
58. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Stem Cells.* 1998;16:413-18.
59. Sanga S, Broom BM, Cristini V, Edgerton M. Gene expression meta-analysis supports existence of molecular apocrine breast cancer with a role for androgen receptor and implies interaction with ErbB family. *BMC Med Genomics.* 2009; 2:59-64.
60. Schnitt PT, Vincent-Solomon A. Columnar cell lesions of the breast. *Adv Anat Pathol* 2005;205:248-54.
61. Selim AG, El-Ayat G, Wells CA. c-erbB2 oncoprotein expression, gene amplification and chromosome 17 aneusomy in apocrine adenosis of the breast. *J Pathol.* 2000;191:138-42.

62. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor- α and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 2002;160:597-04.
63. Shrestha – Bhattari T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene*. 2010;29:3873-80.
64. Siegel S, Castellan Jr. NJ. Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento. 2ª Ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006.
65. Sivaraman L, Conneely OM, Medina D, O'Malley BW. p53 is a potential mediator of pregnancy and hormone-induced resistance to mammary carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12379-84.
66. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
67. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn, 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 USA*. 2001;98:10869-74.
68. Stark A, Hulka BS, Joens S, Novotny D, Thor AD, Wold LE, Schell MJ, Melton III LJ, Liu ET, Conway K. HER-2/ neu amplification in benign breast disease and the subsequent risk of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18:267-74.
69. Stein S, Thomas EK, Herzog B, Westfall MD, Rocheleau JV, Jackson RS, Mai W, Peng L. NDRG1 is necessary for p53 dependent apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;47:48930-40.
70. Tai LT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist. Update* 2008;11:231-46.

71. Tucker PA, Sallai L. The AAA+ superfamily – a myriad of motions. *Curr Opin Struct Biol* 2007;17:641-52.
72. Wagner KU, Boulanger CA, Henry MD, Sgagias M, Hennighausen L, Smith GH. An adjunct mammary epithelial cell population in parous females: its role in functional adaptation and tissue renewal. *Development* 2002; 129: 1377-86.
73. Walsh T, King M-C. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* 2007;11:103-05.
74. Watkins G, Douglas-Jones A, Bryce R, Mansel RE, Wen JG. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids*. 2005;72:267-72.
75. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010;220:263-80.
76. Wells CA, El-Ayat GA. Non-operative breast pathology: apocrine lesions. *J Clin Pathol*. 2007;60:1313-20.
77. Viacava P, Naccarato AG, Bevilacqua G. Apocrine epithelium of the breast: does it result from metaplasia? *Virchows Arch*. 1997;431:205-09.
78. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colo-rectal tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319:525-32.
79. Xiao-Bo Q, Yi-Ling, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, Parvin JD, Dutta A. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J Biol Chem* 1998;273:27786-93.