Paulo Roberto de Alcantara Filho

**Caracterização molecular de tumores de
mama triplo-negativos com diferença
de expressão de *SPARC***

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Aparecida Nagai

**Versão Corrigida. A versão original se encontra
disponível tanto na Biblioteca da Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo quanto na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD).**

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alcantara Filho, Paulo Roberto

Caracterização molecular de tumores de mama triplo-negativos com diferença de expressão de SPARC / Paulo Roberto de Alcantara Filho -- São Paulo, 2017.

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

Orientador: Maria Aparecida Nagai

Descritores: 1. Neoplasias de mama triplo negativas 2. Proteína SPARC
3. Expressão gênica 4. Biomarcadores 5. Intervalo livre de doença 6. Prognóstico

USP/FM/DBD-241/17

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

**“Não deixe que ninguém tire a sua esperança”.
Papa Francisco**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo e Sonia, que me deram os exemplos de integridade e dedicação necessários a qualquer atividade em que esteja envolvido. `A Camila, minha amada irmã e companheira para todas as situações. Ao meu mestre e amigo, Prof. Dr. José Luiz Barbosa Bevilacqua, cujo o exemplo moral e profissional continua a me guiar.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes envolvidos neste estudo, os quais sem eles não poderíamos realizar este trabalho.

`As diretorias do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio aos alunos e aprimoramento cada vez maior da pós-graduação.

`A Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, minha orientadora neste desafio molecular para o aprendizado e evolução no conhecimento do câncer de mama.

`As amigas Msc. Ana Carolina Pavanelli e Dra. Flavia Rotea Mangone, pela parceria, estímulo, e grande auxílio na coleta de informações, realização técnica dos ensaios científicos e colaboração nas análises estatísticas.

`A querida patologista, Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório, pela disponibilidade, conhecimento e energia empregados em dias de leitura dos “Tissue Micro Arrays”, no departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, qualidades indispensáveis para que este estudo fosse finalizado.

Aos técnicos envolvidos nos ensaios laboratoriais realizados nas 2 instituições, em especial aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, pela preparação técnica das lâminas e padronização dos anticorpos utilizados neste trabalho.

`As queridas Carla Curi e Silvana Soares, pela preciosa colaboração em tudo que estivesse ao alcance.

`A Sra. Suely Francisco, pela competência inigualável em formatar esta tese.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas.....	xiv
Resumo.....	xvii
Summary.....	xix
1 Introdução.....	1
1.1 Epidemiologia do Câncer de Mama.....	2
1.2 Aspectos Clínicos e Fatores Prognósticos do câncer de mama.....	3
1.3 Classificação imunofenotípica e molecular dos Subtipos de Câncer de Mama.....	4
1.4 Tumor de Mama Triplo-Negativo.....	7
1.5 Perfil Histológico do Tumor Triplo-Negativo.....	9
1.6 Tumor de Mama Basal-like.....	10
1.7 Mutações nos genes BRCA em TNBC.....	11
1.8 Tratamento Sistêmico e Prognóstico.....	12
1.9 Matriz Extra-celular (MEC).....	13
1.10 Proteína SPARC (Secreted Protein Acidic and rich in Cystein).....	13
2 Objetivos.....	21
2.1 Primário.....	21
2.2 Específicos.....	21
3 Materiais e Métodos.....	23
3.1 Material biológico.....	23
3.2 Análise do Perfil de expressão gênica por cDNA <i>microarray</i>	24
3.3 Construção dos <i>tissue microarrays</i> (TMAs).....	26
3.4 IHC do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	27
3.5 Avaliação imuno-histoquímica (IHQ).....	28
3.6 Análise estatística.....	29

4	Resultados.....	31
4.1	Análise do perfil de expressão gênica.....	31
4.2	Avaliação imuno-histoquímica das proteínas SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A em TMAs contendo TNBCs.....	46
4.3	Análise de sobrevivência.....	52
5	Discussão.....	79
6	Conclusões.....	88
7	Anexos.....	90
	Anexo A -Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.....	90
	Anexo B -Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.....	91
8	Referências.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tumores Triplo-negativos e Tumores Basal-like.....	11
Figura 2	Estrutura e propriedades funcionais da proteína SPARC.....	14
Figura 3	Curvas de Kaplan–Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com câncer de mama de imunofenótipo triplo-negativo, baseados no status de SPARC.....	19
Figura 4	Esquema demonstrando a montagem do bloco do tissue microarray a partir do bloco doador e a lâmina de histologia para a análise.....	26
Figura 5	Diagrama de Venn gerado a partir dos genes identificados como diferencialmente expressos nas 3 análises comparativas.....	32
Figura 6	Distribuição dos transcritos positivamente expressos na comparação TNBC SPARC - vs TNBC SPARC + quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.....	35
Figura 7	Distribuição dos transcritos negativamente expressos na comparação TNBC SPARC - vs TNBC SPARC + quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.....	36
Figura 8	Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em TNBC-SPARC – vs TNBC-SPARC+.....	37
Figura 9	Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em TNBC-SPARC - vs TNBC-SPARC+.....	39

Figura 10	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene SOHLH2.....	41
Figura 11	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene DNAJC12.....	42
Figura 12	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene LIM-1.....	43
Figura 13	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene CEACAM5.....	44
Figura 14	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene CTAG1A.....	45
Figura 15	Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo SPARC no citoplasma e estroma.....	55
Figura 16	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC.....	56

Figura 17	Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo DNAJC12.....	57
Figura 18	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de DNAJC12.....	58
Figura 19	Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo LIM.....	59
Figura 20	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de LIM-1.....	60
Figura 21	Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo SOHLH2 no citoplasma e núcleo.....	61
Figura 22	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SOHLH2.....	62
Figura 23	Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CEACAM5.....	63
Figura 24	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de CEACAM5.....	64
Figura 25	Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CTAG1A.....	65
Figura 26	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de CTAG1A.....	66

Figura 27	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / SOHLH2.....	68
Figura 28	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / CTAG1A.....	70
Figura 29	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / LIM-1.....	72
Figura 30	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / CEACAM5; teste de log-rank (Mantel Cox).....	74
Figura 31	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / DNAJC12.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Subtipos Moleculares do Câncer de Mama determinados por perfil de expressão genética.....	6
Tabela 2	Classificação Imunofenotípica dos principais subtipos de câncer de mama.....	6
Tabela 3	Tumores triplo negativos classificados segundo a expressão imuno-histoquímica de SPARC e sobrevida selecionados para análise por cDNAmicroarray.....	24
Tabela 4	50 genes mais diferencialmente expressos identificados nas análises de transcriptoma: SPARC Negativo vs SPARC Positivo – positivamente regulados.....	32
Tabela 5	50 genes mais diferencialmente expressos identificados nas análises de transcriptoma: SPARC Negativo vs SPARC Positivo – negativamente regulados.....	34
Tabela 6	Características anátomo-clínicas das pacientes com tumores triplo-negativos incluídas no ensaio por TMA, para os 6 genes selecionados.....	48
Tabela 7	Dados representativos do comportamento dos anticorpos analisados no ensaio de TMA, para os genes SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A.....	50
Tabela 8	Dados representativos de sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes incluídas no ensaio de TMA, para os genes SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

-	negativo
%	porcentagem
~	Aproximadamente
+	positivo
<	menor
=	igual
>	maior
>=	maior ou igual
®	registrado
μL	microlitro
μm	micrometro
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clinica
BL1	<i>basal-like 1</i>
BL2	<i>basal-like 2</i>
BM-40	<i>Basement membrane-40</i>
BRCA-1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BRCA-2	<i>breast cancer 2, early onset</i>
CAP	Colégio Americano de Patologia
CEACAM5	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5</i>
CGA	campo de grande aumento
CK	citoqueratina
cm	centímetro
cm ³	centimetro cubico
CTAG1A	<i>cancer/testis antigen 1A</i>
DNAJC12	<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C12</i>
DP	desvio padrão
Dr.	Doutor
EC	C-terminal
EC	estádio clinico

ECM	matriz extracelular
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EUA	Estados Unidos da America
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FS	<i>folistatin-like</i>
FUP	<i>follow up</i>
h	hora
H&E	hematoxilina & eosina
H₂O	agua
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HR	<i>hazard ratio</i>
IC	intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Cancer do Estado de São Paulo
IHQ	imuno-histoquímica
IM	imunomodulatório mesenquimal
kDa	kilodalton
L	litro
LAR	receptor de andrógeno luminal
LIM-1	<i>LIM homeobox 1</i>
M	mesenquimal
MCF10A	linhagem <i>cellular epithelial</i> não tumorigênica
mm	milimetro
mM	miliMol
MSL	tronco mesenquimal
Mx	Classificacao M (mestastase a distancia)
N	Classificacao N (metástase linfonodal)
NDRG1	<i>N-myc downstream regulated 1</i>
ng	nanograma
nm	nanometro
NT	N-terminal
ø	Obito

°C	graus Celcius
p	nível estatístico de significância
p	valor estatístico de p
pág.	página
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
pCR	resposta patológica completa
Prof.	Professor
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
REC	recorrência.
RH	Receptores hormonais
SED	sem evidência de doença
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
SOHLH2	<i>spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix</i>
2	
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and rich in Cystein</i>
ST	estadio
T	Classificacao T (tumor primário)
TMA s	<i>tissuemicroarrays</i>
TNBC	tumor de mama triplo-negativo
UV	ultravioleta
vs	versus
X	Veze

RESUMO

de Alcantara Filho, P.R. *Caracterização molecular de tumores de mama triplo-negativos com diferença de expressão de SPARC*. [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é um dos tumores mais agressivos, muitas vezes resistentes à terapia sistêmica e com evolução para doença metastática. O entendimento de sua biologia e a concepção de novos tratamentos são essenciais para melhorar o seu prognóstico. Atualmente, as opções de tratamento são reduzidas e a quimioterapia ainda é o tratamento padrão. A expressão de SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) é supostamente alterada em várias doenças malignas. No entanto, pouco se sabe sobre o valor prognóstico do SPARC em pacientes com TNBC. Usando uma pequena coorte de descoberta de TNBC muito bem caracterizada em relação à expressão do SPARC e comportamento clínico, conseguimos identificar vários genes como diferencialmente expressos na comparação entre amostras de TNBC / SPARC negativo vs. TNBC / SPARC positivo. Cinco desses genes diferencialmente expressos, SOHLH2, DNAJC12, LIM-1, CEACAM-5 e CTAG1A foram escolhidos para serem validados por imuno-histoquímica (IHC) em *tissue microarrays* (TMAs) contendo uma coorte independente de TNBC. Para acessar o valor prognóstico desses potenciais novos biomarcadores, avaliamos a associação entre a expressão de IHC e os resultados das pacientes pela análise de Kaplan-Meier para a coorte de validação. Foi observado que a coloração negativa da expressão de SOHLH2 e coloração positiva de DNAJC12 e LIM1 mostrou uma tendência a ser correlacionada com um pior prognóstico tanto para a sobrevida livre de doença quanto para sobrevida global. Nossos resultados fornecem novas informações sobre alterações transcriptômicas associadas ao comportamento clínico de TNBC que podem servir como ferramenta potencial para a identificação e caracterização de novos biomarcadores candidatos como fatores prognósticos e preditivos para pacientes com TNBC no futuro.

Descritores: Neoplasias de mama triplo-negativos; Proteína SPARC; Expressão gênica; Biomarcadores; Intervalo livre de doença; Prognóstico

ABSTRACT

de Alcantara Filho, P.R. *Gene expression profiling of triple negative breast tumors with different expression of SPARC identify potential new prognosis biomarkers*. [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive, therapy-resistant, and metastatic tumors. Understanding of its biology and designing new treatments are essential to improve its prognosis. Currently, treatment options are reduced, and chemotherapy is still the standard treatment. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) expression is reportedly altered in various malignancies. However, little is known regarding the prognostic value of SPARC in TNBC patients. Using a small discovered cohort of TNBC very well characterized regarding SPARC expression status and clinical behavior, we were able to identify several genes as differentially expressed in the comparison between TNBC/SPARC negative vs. TNBC/SPARC positive samples. Five of these differentially expressed genes, SOHLH2, DNAJC12, LIM, CEACAM-5 and CTAG1A were chosen to be validated by immunohistochemistry (IHC) on tissue microarrays (TMAs) containing an independent cohort of TNBC. To access the prognostic value of these potential new biomarkers, we evaluated the association between the IHC expression and patient's outcomes by Kaplan-Meier analysis for the validation cohort. We found that negative staining of SOHLH2 expression and positive staining of DNAJC12 and LIM1 showed a trend to be correlated with a poor prognosis for both disease-free survival and overall survival. Our findings provide new information on transcriptome changes associated the clinical behavior of TNBC that may serve as a potential tool for the identification and characterization of new candidate biomarkers as prognostic and predictive factors for patients with TNBC in the future.

Descriptors: Triple-negative breast Neoplasm; SPARC Protein; gene expression; Biomarkers; Disease-free-survival; Prognosis

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer de Mama

O Câncer de mama é o 2º tipo de câncer mais comum no mundo todo, e de longe, o mais frequente entre as mulheres com uma estimativa de 1.67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012 – o equivalente a 25% de todos os cânceres. Desde as estimativas de 2008, a incidência de mulheres com câncer de mama aumentou mais de 20%, enquanto a taxa de mortalidade subiu 14%.¹ Existem atualmente 6.3 milhões de mulheres vivas que foram diagnosticadas com câncer de mama nos últimos cinco anos¹⁻². Para o Brasil, em 2016, são esperados 57.960 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (74,30/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro-Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (22,26/100 mil)³.

Em geral, há uma tendência mundial mostrando que nos países em desenvolvimento, os quais estão passando por rápidas mudanças sociais e econômicas, a transição para estilos de vida típicos de países industrializados leva a uma carga crescente de neoplasias associadas à fatores de riscos reprodutivos, nutricionais e hormonais⁴. Porém, segundo Lee et al.⁵, 20,2% dos pacientes no Brasil foram diagnosticados com câncer de mama em estágio I, 46,8% e 24,6%, nos estágios II e III, respectivamente, enquanto 4,4% já apresentavam-se em estágio IV. Ou seja, o número de casos diagnosticados se concentra em estágios mais avançados da doença, tendo impacto direto tanto no sucesso terapêutico quanto na mortalidade pela neoplasia¹⁻⁶. Isso em muito se deve pelo baixo índice de rastreamento da doença, estimando-se que o sistema público de saúde obtenha taxas anuais em torno de 10% da população alvo⁵. Consequentemente, a taxa de sobrevivência em 5 anos ao câncer de mama gira em torno de 58%, bastante inferior quando comparada a mesma taxa nos EUA, assim como a razão mortalidade-incidência é também mais alta, quando se comparam os dois países (0.291 vs 0.193), respectivamente⁵. Uma visão bastante clara

das diferenças existentes entre o setor público e o setor privado puderam ser observadas em estudo do *The Brazilian Breast Cancer Study Group* (GBECAM) em colaboração com o *MGH-Avon International Breast Cancer Program*, intitulado como Projeto Amazonas, cujo objetivo foi também verificar as diferenças em acesso das pacientes a diferentes opções específicas de tratamento nos dois grupos ⁷.

1.2 Aspectos Clínicos e Fatores Prognósticos do câncer de mama

Os principais fatores prognósticos da doença já estão estabelecidos por diversos estudos ao longo dos últimos 30 anos, sendo eles: diferenciação entre carcinoma invasivo e “in situ”, presença de metástases à distância, presença de metástases em linfonodos, tamanho do tumor, doença localmente avançada, características inflamatórias⁸⁻¹⁰. Dentre todos os fatores citados, destaca-se o *status* do comprometimento axilar como o fator prognóstico mais importante na ausência de doença sistêmica metastática¹¹⁻¹³. Esta informação é fundamental para o tipo de tratamento sistêmico adjuvante e locorregional, sobretudo por influenciar tanto na sobrevida, quanto na mortalidade da doença. Segundo estimativas mais recentes, a sobrevida livre de doença em 10 anos é da ordem de 70-80%, quando não há comprometimento de linfonodos axilares. Nos casos em que há mais de 10 linfonodos positivos, a situação torna-se mais dramática, sendo que apenas 10-15% destas mulheres estarão livres de doença em 10 anos ¹⁴.

Historicamente, o câncer de mama era considerado uma única doença, com variações nas características histopatológicas e respostas ao tratamento sistêmico. Nos anos 1970, contudo, a doença começou a ser dividida em dois subconjuntos distintos com base na expressão do receptor de estrogênio (RE), devido às características clínicas demonstradas por estes subgrupos¹⁵. As decisões quanto ao tratamento eram somente baseadas em variáveis clínico-patológicas, que são fatores prognósticos por natureza, como tamanho, presença de metástase linfonodal, e grau histológico, além de três marcadores preditivos de resposta à terapia endócrina e alvo molecular: receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), e *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER-2), respectivamente¹⁶.

Os experimentos realizados por Perou et al.¹⁷ causaram um enorme impacto

desde o início deste século, transformando a visão da doença. Foi por eles demonstrado que os tumores com receptor de estrogênio positivo e negativo eram fundamentalmente distintos quanto ao perfil de expressão gênica, e o câncer de mama poderia ser dividido em cinco diferentes subtipos moleculares: **luminal A, luminal B, tipo normal de mama, HER-2, e tipo basal**. Em seguida, Sørlie et al.¹⁸, demonstraram que os tumores de mama poderiam ser agrupados hierarquicamente pelo perfil de expressão gênica em cinco diferentes subgrupos com evolução clínica distinta.

Dessa forma, hoje o câncer de mama é visto como um grupo heterogêneo de diferentes doenças caracterizadas por distintas aberrações moleculares, ao invés de uma única doença com variações histológicas e de comportamento clínico distinto.

1.3 Classificação imunofenotípica e molecular dos Subtipos de Câncer de Mama

Atualmente, a classificação do câncer de mama inclui diferentes subtipos: *Luminal A*, que expressam valores elevados de receptores de estrogênio e progesterona, nenhuma expressão de HER-2 e baixo Ki-67, e marcadores basais negativos. Geralmente apresentam bom prognóstico e pouco benefício ao tratamento quimioterápico¹⁹. O subtipo *Luminal B*, apesar de demonstrar níveis semelhantes de expressão dos receptores hormonais, e expressão variada de HER-2, possui uma alta taxa de proliferação, refletida pelo Ki-67 elevado. Diferem-se também por uma melhor resposta à quimioterapia, se comparado ao subtipo *Luminal A*, além de um prognóstico intermediário ou pior²⁰. Já os tumores HER-2 positivo caracterizam-se por ausência de expressão de receptores hormonais e altas taxas de expressão da proteína HER-2, além de um Ki-67 elevado. Podem apresentar taxas de resposta patológica completa à quimioterapia em torno de 50%, quando usado bloqueio isolado com Trastuzumabe, e de até 60%, com a introdução do duplo bloqueio (Trastuzumabe + Pertuzumabe)²¹. Além destes, existe também o subtipo triplo-negativo, e o *basal-like*, que serão descritos subsequentemente de forma mais detalhada²².

Conforme já mencionado, o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) são importantes marcadores prognósticos e preditivos para o câncer de mama. A

avaliação adequada destes marcadores é parte essencial na determinação da biologia tumoral e na indicação de terapias específicas, como a hormonioterapia (para tumores RE e/ou RP positivos), e terapia alvo molecular (para tumores HER-2 positivos).

A caracterização molecular do câncer de mama através do perfil de expressão gênica pôde determinar 5 subtipos distintos, que parecem representar diferentes formas da doença²³. Destacam-se os subtipos luminais A e B, que são diferenciados pelos níveis de expressão de HER-2 e/ou genes de proliferação, um grupo de superexpressores de HER-2, um subtipo “mama normal” ou sem classificação, bem como o grupo *basal-like*, que é representado em grande parte por tumores triplo-negativos, e expressam genes geralmente encontrados nas células basais e mioepiteliais, citoqueratinas 5, 6 (CK5/6) e/ou *EGFR*. Esses subtipos moleculares de câncer de mama diferem em relação aos seus padrões de expressão gênica, características clínicas, resposta ao tratamento e prognóstico, conforme resumido na Tabela 1²⁴.

Outro grupo, chamado “claudin-low”, também composto em sua maioria por tumores triplo-negativos (71%), caracteriza-se pela falta de expressão de marcadores luminais, porém são enriquecidos de marcadores de transição epitélio-mesênquima e genes de resposta imunológica²⁵. Curtis et al.²⁶ identificaram 10 possíveis subtipos de câncer de mama com evoluções clínicas distintas, através de arranjos de expressão genética e variação do número de cópias num universo de 1992 tumores de mama. Embora os tumores triplo-negativos e *basal-like* apresentem características moleculares similares, eles não são sinônimos. Especificamente, 20% dos tumores triplo-negativos expressam marcadores basais, enquanto outros 15% dos tumores não triplo-negativos não os expressam²⁷.

Novos estudos vêm sugerindo uma subdivisão dos tumores triplo-negativos com características distintas dos tumores *basal-like*²⁸. Destacam-se, principalmente, em imunomodulatórios, mesenquimal, tipo tronco-mesenquimal, receptor de andrógeno luminal, e subtipos *basal-like* distintos²⁹.

Tabela 1 - Subtipos Moleculares do Câncer de Mama determinados por perfil de expressão genética.

Subtipo Molecular			
	Luminal	HER-2	Basal
Padrão de Expressão Gênica	↑ expressão de RH e genes associados (Luminal A > Luminal B)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ expressão de HER-2 e outros genes em amplicon. ↓ expressão de RE e genes associados 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ expressão de genes baso-epiteliais, citoqueratinas basais. ↓ expressão de HER-2
Características Clínicas	<ul style="list-style-type: none"> ≈ 70% dos carcinomas invasivos de mama RE/RP positivos Luminal B tende a ser ↑ grau histológico que Luminal A Alguns ↑ HER-2 (Luminal B) 	<ul style="list-style-type: none"> ≈ 15% dos carcinomas invasivos de mama RE/RP negativos Mais propensos ao ↑ grau e N + 	<ul style="list-style-type: none"> ≈ 15% dos carcinomas invasivos de mama Maioria triplo-negativo Disfunção do BRCA-1 (germinativa, esporádica) Mulheres Afro-americanas
Resposta ao tratamento e Prognóstico	<ul style="list-style-type: none"> Responde à terapia endócrina Prognóstico melhor do Luminal A frente ao Luminal B Mais recidivas tardias 	<ul style="list-style-type: none"> Uso de terapia alvo molecular anti-HER2. Respondem à QT baseada em antracíclicos Geralmente bom prognóstico com duplo bloqueio 	<ul style="list-style-type: none"> Sem resposta à Terapia Endócrina e anti-HER-2 Parecem ter sensibilidade à QT baseada com platina e Inibidores da PARP Geralmente prognóstico ruim (de forma não-uniforme) Recidiva > nos 3 primeiros anos

Fonte: Retirado e traduzido de Schnitt²⁴

Tabela 2 - Classificação Imunofenotípica dos principais subtipos de câncer de mama.

Subtipo Molecular	Perfil dos biomarcadores
Luminal A	RE + e /ou RP +, HER-2 -, e Ki-67 baixo (<14%)
Luminal B	RE + e/ou RP + e HER-2 + RE + e/ou RP + e HER-2 -, e Ki-67 alto (>14%)
HER-2	RE-, RP -, HER-2 +
Triplo-negativo	RE e RP <1% e HER-2 -
Basal-like	RE e RP <1% e HER-2 -, e CK5/6 e/ou EGFR positivo

Abreviações: CK, citoqueratina; EGFR, receptor de fator de crescimento epidérmico; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; HER-2, receptor epidérmico humano do tipo 2. NEG, negativo; POS, positivo; Ki-67 – segundo critérios do American College of Pathology – (CAP)

1.4 Tumor de Mama Triplo-Negativo

O tumor de mama triplo-negativo (TNBC) é um termo que se refere a uma coleção heterogênea de tumores de mama caracterizados pela ausência de expressão de RE e RP e ausência de amplificação ou superexpressão de HER-2. Porém, as diretrizes do Colégio Americano de Patologia (CAP) e da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) são mais rigorosas e definiram que níveis de coloração por imuno-histoquímica (IHQ) $< 1\%$ para receptores de estrogênio (RE), $< 1\%$ para receptores de progesterona (RP), e HER-2 negativo por IHQ ou *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), é mais adequado. A ausência de expressão destes marcadores nos TNBC significa que a paciente não se beneficiará de terapia endócrina ou terapias alvo contra o HER-2, restringindo consideravelmente suas opções terapêuticas³⁰⁻³¹.

Em pesquisa simples realizada no Pubmed em 09/10/2016, em se tratando dos tumores triplo-negativos, o termo “*triple negative breast cancer*”, resultou em 6154 artigos. Estes tumores correspondem a 12-17% de todos os tumores de mama, afetando preferencialmente mulheres mais jovens, de descendência africana e hispânica, além de corresponderem a uma alta incidência dentre os “tumores de intervalo”- tumores invasivos que surgem entre exames regulares de rastreamento³²⁻³⁴.

Nos exames de imagem, os achados mamográficos mais comuns nos TNBC são: uma massa sem calcificações, mal definida ou espiculada, com margens e forma irregular. Ao ultra-som, são mais comumente massas hipoecóicas ou complexas com uma forma irregular e margens não circunscritas. Outras características documentadas incluem uma massa de orientação paralela, com um limite de superfície abrupta e sem características acústicas posteriores. Com relação às características na ressonância magnética, é frequente uma massa redonda ou oval com contraste, apresentando margens irregulares ou espiculadas e aumento das bordas (“*rim enhancement*”). Embora o aumento das bordas seja uma característica observada em apenas uma fração de massas malignas na ressonância magnética, ela denota alto valor preditivo positivo para malignidade.³⁵⁻³⁶

Há um crescente reconhecimento da importância deste subtipo tumoral de câncer de mama por oncologistas, patologistas e geneticistas. Como grupo, os pacientes com tumores triplo-negativos são em média de 5-10 anos mais jovens que

pacientes não triplo-negativos, sendo isso parcialmente relacionado à associação destes tumores com a mutação no gene *BRCA*. Clinicamente, apresentam-se como tumores maiores que os outros subtipos, porém, podem estar ocultos mamograficamente, ainda que palpáveis no exame físico, sendo sua incidência 2 vezes maior em afro-americanas, quando comparadas as mulheres brancas/caucasianas³⁷⁻³⁹. Outros fatores, como menarca precoce, alto índice de massa corpórea durante a pré-menopausa, multiparidade e pouca amamentação, estão também intimamente associados com este tipo de neoplasia, que demonstra agressividade aumentada, e períodos de sobrevida significativamente menores traduzidas em altas taxas de recorrência, quando comparados aos outros subtipos tumorais⁴⁰⁻⁴¹.

Em diversos estudos, são citadas taxas de recorrência de 6.7–10.5 % comparadas com uma taxa global de 2.1–6.4 % que inclui todos os outros subtipos de câncer de mama⁴²⁻⁴³. A disseminação metastática de suas células ocorre em sua maioria dentro dos primeiros 3 anos do diagnóstico, sendo principalmente visceral e sistema nervoso central, de forma que as pacientes que não recorrem neste período tendem a ser consideradas curadas. O prognóstico ruim destas pacientes pode ser em grande parte explicado por sua patologia intrínseca agressiva, caracterizada por pleomorfismo nuclear, alto grau histológico e índice de proliferação, metaplasia e alta frequência de mutações do *TP53*⁴⁴.

Pacientes com este subtipo tumoral tem frequentemente pior prognóstico que pacientes com outros subtipos de câncer de mama, com uma sobrevida estimada em 5 anos de 70% para os tumores triplo-negativos, comparado a 80% para todos os outros subtipos⁴⁵. Possuem reduzidas opções terapêuticas, não podendo ser tratados com terapia endócrina ou terapias direcionadas para receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2). Embora novos tratamentos incluindo derivados de platina venham demonstrando serem promissores no tratamento dos tumores triplo-negativos, a quimioterapia padrão ainda permanece como a primeira escolha no combate a doença⁴⁶.

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC), dessa forma, é atualmente o subtipo mais letal da doença, sendo que em sua maior parte exibem padrões *basal-like* de expressão genética. Carecem de terapias alvo moleculares aprovadas clinicamente, sendo tratado quase exclusivamente por quimioterapia tradicional e cirurgia. Embora

a abordagem inicial por quimioterapia (neoadjuvância) possa atingir uma eficácia de até 30% de pacientes com resposta total, a regra ainda é a baixa resposta ao tratamento, que pode ser parcial ou não responderem, com implicação direta no prognóstico⁴⁷⁻⁴⁸. Assim, esta heterogeneidade dos TNBC tem sido um obstáculo para se caracterizar esse grupo de câncer de mama e de desenvolver alvos terapêuticos específicos. Dessa forma, os tumores de mama triplo-negativos devem ser vistos como um grupo heterogêneo de doenças, ao invés de apenas uma única entidade. Embora a maioria seja classificada como carcinomas invasivos sem tipo especial, o restante pertence a outros raros subtipos tais como os tumores medulares, metaplásicos e adenoide cístico⁴⁹. Do ponto de vista molecular, os tumores de mama triplo-negativos (TNBC) são um grupo heterogêneo de doenças que apresentam associações com diversas funções celulares, sendo uma destas alterações já estabelecidas em diversos estudos relacionando-os com a transição epitélio-mesenquima e como também sendo considerado o subtipo de câncer de mama com fenótipo de célula-tronco. Varias tentativas vem sendo feitas para classificar os tumores triplo negativos através de assinaturas genéticas ou marcadores individuais. Segundo Lehmann et al.⁵⁰, além da classificação em 6 subgrupos distintos, incluindo tipo basal 1, tipo basal 2, mesenquimal, imunomodulatório, tipo célula-tronco mesenquimal e receptor de andrógeno luminal (LAR), recentemente foi descrito um subtipo de *claudin-low*, enriquecido para marcadores da TEM, resposta imune e células-tronco carcinogênicas, composto principalmente de subtipos TNBC e células-tronco mesenquimal (MSL).

1.5 Perfil Histológico do Tumor Triplo-Negativo

Baseado num ponto de vista histopatológico, os tumores triplo-negativos são caracterizados pela diversidade de padrões histológicos e subtipos, embora se apresentem, em sua maioria, como carcinomas ductais invasivos de alto grau, com infiltrado linfocitário e necrose⁵¹⁻⁵². Histologicamente, a maioria das TNBCs são classificadas como carcinoma ductal invasivo, sem tipo específico. TNBCs não são definidos pela sua aparência no H&E, mas pela sua falta de expressão de ER, PR e HER2 na coloração imuno-histoquímica²². No entanto, existem características histológicas que sugerem um imunofenótipo triplo negativo. TNBC são tipicamente

caracterizados por um alto grau histológico, com zonas necróticas centrais e “*pushing borders*”⁵³. Os TNBC geralmente revelam uma proliferação fibrosa celular, enquanto que as não-TNBC tendem a ter uma fibrose com alto grau de hialinização. Vasos sanguíneos de tamanho variável, incluindo vasos com paredes espessas, são freqüentemente encontrados em TNBCs.⁵⁴⁻⁵⁵ As características adicionais comumente observadas em TNBCs são um infiltrado linfocítico perilobular no tecido mamário adjacente ao leito tumoral e um infiltrado inflamatório linfocítico intratumoral. Além disso, vários TNBC têm histologias atípicas medulares e metaplásicas. Os carcinomas medulares são caracterizados por carcinomas infiltrantes com bordas circunscritas, infiltrado linfóide periférico denso e têm prognóstico favorável⁵⁶, enquanto que os carcinomas metaplásicos apresentam diferenciação em relação ao epitélio escamoso com componentes mesenquimais e células com morfologia fusiforme, condróide, óssea ou rabdoide.⁵⁷ De fato, são tumores que apresentam heterogeneidade intertumoral e histológica. Dentro desta diversidade, e com comportamento clínico menos agressivo que a maioria dos tumores triplo-negativos, destacam-se os carcinomas adenóide cístico e de padrão medular, que além de mais indolentes, tendem a não apresentar os mesmos benefícios do tratamento sistêmico oferecidos a este grupo de pacientes⁵⁸.

1.6 Tumor de Mama *Basal-like*

Embora reconhecido inicialmente como sinônimo de tumores de mama *basal-like*, os tumores triplo-negativos têm se mostrado marcadamente heterogêneos ao nível do transcriptoma⁵⁹. Tumores de mama *basal-like* são geralmente de alto grau histológico e expressam genes geralmente encontrados nas células basais e mioepiteliais do tecido mamário normal. Rakha et al.⁶⁰ subsequentemente propuseram que estes tumores se caracterizam do ponto de vista imuno-histoquímico em: RE, RP e HER-2 negativos, bem como CK5/6, CK14, e CK17 positivos, ou EGFR positivo. Existem, atualmente, fortes evidências que este subtipo tumoral se origine de células progenitoras luminais negativas do receptor de estrogênio⁶¹.

Ainda que se apresentem com comportamento clínico agressivo, quase 40% das pacientes respondem aos regimes de quimioterapia vigentes⁶².

Fonte: adaptado de Hudis; Gianni³³

Figura 1 - Tumores de mama Triplo-negativos e Tumores de mama *Basal-like -Triple-negative Breast Cancer: Range of histology*

1.7 Mutações nos genes *BRCA* em TNBC

BRCA1 e BRCA2 são genes importantes associados à susceptibilidade ao câncer de mama. Mutações germinativas no gene *BRCA1*, responsável pela susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama e ovário, estão associados com tumores triplo-negativos sendo que este fenótipo tumoral contribui com 60-80% dos casos em mulheres portadoras destas mutações⁶³.

Quanto ao gene *BRCA2*, a incidência associada desta mutação com os tumores triplo-negativos varia entre 16-23%⁶⁴. Vários estudos mostraram que há custo-benefício em realizar testes para detecção de mutações no *BRCA* em pacientes com diagnóstico abaixo dos 50 anos com tumores triplo-negativos, independente da história familiar, podendo chegar a 44% de positividade para mutações em pacientes até 40 anos, que se apresentam com este subtipo de câncer de mama⁶⁵⁻⁶⁶.

1.8 Tratamento Sistêmico e Prognóstico

Com relação à terapêutica destes tumores, estudos de neoadjuvância sugerem que esta é uma boa escolha inicial de tratamento, principalmente em paciente com estadio mais avançado da doença, e que já manifestam comprometimento clínico axilar. A resposta clínica e radiológica completa geralmente denotam uma taxa de resposta patológica completa, o que se traduz em melhor evolução prognóstica; em contrapartida, para a maioria que ainda apresenta doença residual após o tratamento, o prognóstico é relativamente pobre⁶⁷.

Em estudo comparando pacientes com tumores triplo-negativos com não triplo-negativos, que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante, sugere-se que quando ocorre resposta patológica completa, as pacientes apresentam índice de sobrevida semelhante em três anos. Por outro lado, quando a resposta não é completa, há uma redução de 30% desta sobrevida global em três anos, comparado aos tumores não triplo-negativos⁶⁸.

No estadio II a III de TNBC, a adição de carboplatina ou bevacizumabe à quimioterapia neoadjuvante aumentou as taxas de pCR, mas se isso irá melhorar a sobrevida livre de recidiva ou global é desconhecida, embora o papel da carboplatina tem sido bastante promissor, demonstrando um particular benefício de sua inclusão no tratamento sistêmico destas pacientes⁶⁹. Estas observações sugerem que há um subgrupo de mulheres com tumores triplo-negativos que são extremamente sensíveis à quimioterapia, enquanto outras mulheres possuem um benefício incerto⁷⁰. Tal comportamento revela que possivelmente alguns destes tumores possuem resistência ao tratamento quimioterápico, contribuindo para altas taxas de mortalidade pela doença⁷¹. Muitos fatores contribuem para isso, dentre os quais as mutações genéticas que são adquiridas em múltiplas etapas da tumorigênese. A melhor seleção e diferenciação dentro deste subtipo tumoral poderá trazer novas oportunidades de tratamento mais eficazes, individualizadas e com menos efeitos colaterais.

Atualmente, nenhum agente alvo específico possui aprovação da Agência de Medicamentos dos EUA (FDA) ou Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para tratar TNBC nas configurações adjuvantes, neoadjuvantes ou metastáticas. Embora

não haja alterações comuns no TNBC, vários receptores de fatores de crescimento são superexpressos em vários subtipos da doença.

Abramson e Lehmann⁷² revelaram 6 subtipos com características peculiares de expressão gênica, incluindo 2 “*basal-like*” (BL1 e BL2), um perfil imunomodulatório (IM), um mesenquimal (M), um tronco mesenquimal (MSL) e finalmente, o subtipo receptor de andrógeno luminal (LAR). Aparentemente, tais subtipos parecem direcionar possíveis assinaturas moleculares distintas, apresentando-se como potenciais alvos de tratamento mais apropriados.

1.9 Matriz Extra-celular (MEC)

Os tumores de mama malignos são caracterizados pela perda de arquitetura de tecido normal e interações célula-MEC⁷³. Isto é ilustrado pelas mudanças na constituição da MEC durante a transformação epitélio-mesenquimatosa, processo em que as células perdem sua forte adesão intercelular, que é uma manifestação precoce do desenvolvimento maligno de células epiteliais⁷⁴.

A MEC é definida como uma mistura complexa de proteínas (proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, como colágenos e lamininas) que fornecem suporte estrutural e mecânico para células e tecidos, e também tem um papel importante na regulação da expressão gênica, divisão celular, sobrevivência, forma e movimento⁷⁵. É, de fato, através dessas interações recíprocas que o tumor cria um microambiente favorável à proliferação, para o recrutamento de novos vasos sanguíneos e para a estimulação da produção de proteases que podem degradar os tecidos adjacentes, aumentando a probabilidade de sensibilidade ao fármaco, mas também a invasão tumoral⁷⁶.

1.10 SPARC (Secreted Protein Acidic and rich in Cystein)

O gene *SPARC* (*Secreted Protein Acidic and rich in Cystein*) está localizado no cromossomo 5q31-33 e é responsável pela codificação de uma glicoproteína de ligação à albumina de 42 kDa, que modula suas interações com a matriz extracelular, também conhecida com Osteonectina ou BM-40. Essa proteína foi primeiramente descrita por Termine et al.⁷⁷, como uma proteína específica dos ossos. Proteínas

matricelulares são secretadas dentro do microambiente extracelular, e apresentam funções regulatórias. Essas proteínas são descritas como sendo capazes de afetar diretamente o destino das células, não apenas influenciando a transição epitélio-mesênquima, como também a proliferação e sobrevivência (anti-apoptose), motilidade celular e invasão, adesão, extravasamento, proliferação aos sítios metastáticos, angiogênese⁷⁸. Além disso, parece atuar em atividades relacionadas à mineralização óssea, remodelamento tecidual, migração de célula endotelial, morfogênese, como também um efeito antiproliferativo sobre células endoteliais, mesangiais e fibroblastos⁷⁹⁻⁸¹.

A proteína SPARC é composta por três domínios funcionais que contribuem para as suas distintas propriedades biológicas⁸². O domínio N-terminal (NT) está envolvido com espreadimento celular, além de apresentar propriedades quimiossensibilizadoras, o domínio “follistatin-like” (FS) contém 10 resíduos de cisteína e inibe a migração celular endotelial, e o domínio C-terminal (EC) contém o módulo de ligação ao cálcio extracelular apresentando propriedades anti-angiogênicas⁸³.

Figura 2 - Estrutura e propriedades funcionais da proteína SPARC - Proteína SPARC com seus três domínios funcionais. O domínio Follistatin-like, é mostrado em marrom, verde e preto, o domínio C-terminal, que compreende os aminoácidos 138 a 286 é mostrado em lilás e amarelo.

Sabe-se que a proteína *SPARC* não funciona apenas para modular interações célula-célula e célula-matriz. Através de suas propriedades inibidoras do crescimento em células não transformadas, houve um maior interesse em avaliar o seu papel na carcinogênese. Embora já exista forte evidência de uma importante participação do *SPARC* em vários processos metabólicos, ainda persistem muitas dúvidas com relação ao real papel do gene nas diversas doenças, principalmente o câncer, onde o *SPARC* pode contribuir de forma ambivalente. Enquanto em alguns tipos de tumores o gene se comporta como um supressor tumoral, em outros, porém, apresenta-se como *oncogene*. Estes papéis divergentes refletem a complexidade desta proteína, que em certas neoplasias, como melanomas e gliomas, parece estar associada com um fenótipo altamente agressivo, enquanto que em outras, como de ovário, neuroblastomas e tumores colorretais, o *SPARC* pareceu funcionar como um supressor tumoral. Dessa forma, não existe ainda um modelo unificado que possa explicar todas as suas funções e suas contribuições para o desenvolvimento e para a progressão da doença⁸⁴⁻⁸⁵.

Um mecanismo primordial da carcinogênese que tem sido atribuído ao *SPARC* e que parece desempenhar um papel relevante no rápido crescimento dos tumores é a angiogênese. Em estudo com gliomas cerebrais foram evidenciadas expressões aumentadas do *SPARC*, principalmente quando apresentou expressão aumentada, sendo que as lesões apresentaram um importante componente infiltrativo. Entretanto, tais tumores apresentaram-se com menor volume, comparados àqueles com expressão diminuída, corroborando talvez para que o *SPARC* esteja relacionado a infiltração tumoral⁸⁶. Resultados semelhantes foram descritos por Rempel et al.⁸⁷, que também concluíram que a expressão aumentada do *SPARC* se relacionou aos tumores menores, porém, com um comportamento muito mais invasivo.

Enquanto o mecanismo principal relacionado ao comportamento agressivo dos gliomas em resposta às diferentes expressões do *SPARC* ainda seja incerto, parece que neste tipo de tumor cerebral, o *SPARC* tem um efeito prejudicial, promovendo a invasão celular. Em se tratando de neoplasias de ovário, a expressão aumentada do *SPARC* revelou um papel oposto, desempenhando uma função inibitória no crescimento destes tumores.

Na tentativa de avaliar o efeito da expressão do *SPARC* com relação ao carcinoma de ovário, Said et al.⁸⁸ criaram um modelo animal de ratos com

carcinomatose peritoneal, tendo como objetivo avaliar o processo de metastatização da doença. Comparando-se níveis opostos de expressão do gene, quando a expressão do *SPARC* era baixa, houve uma maior proliferação celular e uma menor taxa de apoptose, em comparação com o tipo selvagem, além de menor sobrevida global⁸⁸. Yiu et al.⁸⁹ reforçaram este conceito, demonstrando uma correlação inversa entre altos níveis de *SPARC* com o grau de invasão tumoral, em estudo envolvendo carcinoma de pâncreas e pulmão *SPARC* -/-.

Além das diversas funções de *SPARC* descritas acima, a expressão de *SPARC* tem sido relacionada a propriedades de quimiossensibilidade a drogas. Em alguns tipos de tumores, como o colorretal, a expressão do *SPARC* parece reverter a resistência terapêutica, cuja expressão genética apresenta-se reduzida em células já resistentes. Tai et al.⁷¹ demonstraram que genes envolvidos na regulação do ciclo celular, como o p21 e p27, parecem conferir proteção ao tumor, impedindo a apoptose celular. Dessa forma, uma exposição ao tratamento quimioterápico levaria à uma expansão clonal de células tumorais que adquiriram alterações genéticas adicionais as quais, posteriormente, promovem resistência à terapia. Utilizando-se a técnica de cDNA *microarray* com o intuito de identificar potenciais genes envolvidos com a quimiorresistência, os autores identificaram o gene *SPARC* (*secreted protein, acid and rich in cysteine*) como um gene capaz de reverter pontualmente a resistência à quimioterapia, demonstrando baixos níveis de expressão de *SPARC* em células de carcinoma colorretal humanas refratárias MIP101. Além disso, com a re-expressão do gene, pode-se perceber uma restauração da sensibilidade à quimioterapia, bem como retorno da radiosensibilidade.

O papel de *SPARC* como um potencial quimiossensibilizador está associado a sua capacidade em aumentar a cascata apoptótica, embora os mecanismos exatos ainda não sejam bem claros. Esta atividade pró-apoptótica também foi percebida em tumores de ovário, pâncreas, pulmão e neoplasias gastrointestinais, de tal forma que existem fortes evidências de uma melhor resposta aos quimioterápicos administrados previamente, antes resistentes nestes tumores, numa forma de reversão do processo de resistência terapêutica⁸⁴⁻⁹⁰⁻⁹¹.

A capacidade do *SPARC* em promover uma maior apoptose “in vitro” e “in vivo” após a exposição à agentes citotóxicos são em parte, devido à sua interação com

Caspase-8, que conduz à ativação da via extrínseca da apoptose⁹¹.

Com relação ao carcinoma de mama, ensaios realizados “in vitro” relacionaram altos níveis de expressão do *SPARC* em diversas amostras da doença, sendo evidenciada certa habilidade do gene em inibir a proliferação celular⁹²⁻⁹⁵. Wong et al.⁹⁶ também observaram que em torno de 60% dos pacientes com baixos níveis de expressão de *SPARC*, já apresentavam-se com metástases nos primeiros 5 anos. Dessa forma, tais resultados parecem sugerir que níveis baixos de expressão de *SPARC* estão associados com um fenótipo mais agressivo de tumor.

Além das diferenças no padrão de expressão de *SPARC* entre os diferentes subtipos de tumores de mama, parece também haver diferentes expressões de *SPARC* no componente estromal ao redor do tecido maligno. Em 25 biópsias de mama contendo carcinoma ductal invasivo, Barth et al.⁹⁷, compararam a expressão gênica do *SPARC*, *TGF BETA*, *CD-34* e *SMA*, observando-se uma forte expressão citoplasmática do *SPARC* em células do estroma ao redor das células malignas, enquanto o mesmo estava ausente em células de mama normal. Em casos de alta expressão estromal do *SPARC*, parece haver um aumento da sobrevida específica para a doença. Isto também é reforçado pelos resultados de 2 estudos mostrando que a superexpressão do *SPARC* no componente estromal das pacientes com câncer de mama foi relacionado a um melhor prognóstico⁹⁸⁻⁹⁹.

Sendo que 75% dos tumores que se desenvolvem em mulheres portadoras de mutações no *BRCA-1* apresentam um fenótipo triplo-negativo¹⁰⁰, Smid et al.¹⁰¹ evidenciaram algo ainda mais provocativo, relacionando tumores que apresentavam mutação no *BRCA-1* com expressões gênicas diminuídas do *SPARC*. Sabe-se que uma pequena parcela dos tumores triplo-negativos apresenta resposta patológica completa, e eventualmente apresentam-se com melhor evolução, quando confrontados com aqueles em que a resposta é pobre, com prognóstico bastante reservado. Coincidentemente, grande parte dos tumores triplo-negativos parece relacionar-se com níveis reduzidos de expressão de *SPARC*, o que poderia explicar estas evoluções clínicas divergentes dentro do mesmo subtipo de carcinoma mamário. Sendo assim, a comparação de tumores triplo-negativos de comportamentos distintos poderá trazer informações relevantes, principalmente em relação à sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Em 2011, o grupo de Oncologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em estudo conduzido por Nagai et al.¹⁰² envolvendo a relação de expressões alteradas de *SPARC* e N-myc downstream regulated 1 (*NDRG1*), em diversas malignidades, incluindo o câncer de mama, utilizou-se de estudo de imuno-histoquímica em *microarrays* de tecido contendo espécimes tumorais de mama de pacientes com 10 anos de seguimento. O status de expressão do *NDRG1* e *SPARC* foi correlacionado com variáveis prognósticas e com a sobrevida clínica dos pacientes. A positividade do *NDRG1* mostrou-se diretamente associada com redução da sobrevida livre de doença ($p < 0.001$) e sobrevida global ($p < 0.001$). Em contrapartida, pacientes expressando níveis reduzidos de *SPARC* tiveram pior sobrevida livre de doença ($p = 0.001$) e sobrevida global ($p = 0.001$) comparados àqueles que expressaram altos níveis da proteína. Análise combinada dos dois marcadores revelou que, tanto a sobrevida livre de doença quanto as taxas de sobrevida global foram menores em tumores que expressaram positividade ao *NDRG1* e negatividade ao *SPARC* ($p < 0.001$). Mais além, quando avaliados apenas os tumores triplo-negativos segundo a expressão de *SPARC*, percebe-se facilmente de forma significativa a pior evolução da doença em casos de baixa expressão de *SPARC*¹⁰². Através destes resultados promissores, instiga-se o fato de melhor avaliarmos os diferentes comportamentos dos tumores triplo-negativos, já que uma grande parte destes tumores apresenta prognóstico ruim quando não apresentam resposta patológica completa ao tratamento quimioterápico. Se a superexpressão do *SPARC* contribui para uma melhor resposta destes tumores ao tratamento quimioterápico, identificar tumores com alta expressão da proteína poderá selecionar tumores bons e maus respondedores ao tratamento. Desta forma, o *SPARC* surge como um potencial marcador de agressividade para os tumores triplo-negativos, podendo selecionar os pacientes que irão ou não se beneficiar do tratamento sistêmico.

Fonte: Nagai et al.¹⁰²

Figura 3 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com câncer de mama de imunofenótipo triplo-negativo, baseados no *status* de *SPARC*. A expressão negativa para *SPARC* relacionou-se com pior prognóstico.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

Análise de alterações do transcriptoma de tumores de mama triplo-negativos com diferença de expressão de *SPARC*.

2.2 Específicos

- 1 Anotação dos 50 genes mais diferencialmente expressos na comparação entre os tumores triplo negativos com diferença de expressão de *SPARC* (“*up*” regulados e “*down*” regulados) para serem avaliados por imuno-histoquímica em tissue microarrays (TMAs)
- 2 Seleção dos 6 genes a serem validados (*SPARC*, *SOHLH2*, *LIM-1*, *CEACAM-5*, *DNAJC12* e *CTAG1A*), por imuno-histoquímica em tissue microarrays (TMAs).
- 3 Comparação dos dados obtidos com as análises de TMA com as características clinicopatológicas e de sobrevida das pacientes, para identificação de potenciais candidatos a biomarcadores de prognóstico para tumores de mama triplo negativos.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Para este estudo retrospectivo foram utilizadas, inicialmente, 6 amostras do bioestoque do Laboratório de Genética Molecular do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo, ICESP.

Todas as pacientes foram diagnosticadas com carcinomas ductais invasivos de mama, com grau histológico e nuclear 3, com tumores entre 12-105 mm, com imunofenótipo triplo-negativo. A média de idade foi de 49 anos, sendo 64% pré-menopausadas. Todas as mulheres apresentavam acometimento linfonodal ao diagnóstico, com estágio clínico II e III, sendo o tempo médio de seguimento de 76.8 meses.

As amostras de tumor foram dissecadas para a remoção de tecido normal residual antes de serem congeladas e estocadas em nitrogênio líquido até o momento da extração do *DNA* e *RNA*. Todos os casos selecionados apresentavam-se com material suficiente para análise genômica, bem como informações relativas à biologia tumoral e evolução clínica das pacientes, como sobrevida livre de doença e sobrevida global. As amostras dos pacientes selecionados para o estudo foram caracterizadas quanto à expressão imuno-histoquímica de *SPARC* e sobrevida, sendo três pares com baixa expressão de *SPARC* e baixa taxa de sobrevida, e três pares com alta expressão de *SPARC* e alta taxa de sobrevida. Tendo como ponto de corte para análise a mediana do valor de expressão do *SPARC* em 90, isto é, expressão acima deste valor reflete a superexpressão do *SPARC* na amostra, enquanto valores inferiores traduzem a baixa expressão do gene¹⁰², conforme demonstrado na tabela 3.

Para os experimentos de *cDNA microarray* foram utilizados os mesmos seis pares de amostras (normal e tumor) dos casos classificados segundo a expressão de *SPARC* e taxa de sobrevida (baixa expressão – menor sobrevida e alta expressão – alta sobrevida).

Para validação dos achados, foi utilizado o banco de dados do A.C.Camargo Cancer Center, que continha amostras de 97 pacientes com imunofenótipo triplo-negativo, as quais poderiam ser potencialmente utilizadas para os ensaios de *tissue microarray* (TMA). Contudo, haviam 51 pacientes com material disponível e suficiente para as análises. A avaliação deste banco de dados mostrou que todas as pacientes apresentaram carcinoma ductal invasivo com alto grau histológico e nuclear, com tumores entre 10-100 mm, estádios I-IV. O tempo médio de seguimento foi de 71,7 meses (IC 95%), com sobrevida mediana de 68,7 meses.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, Protocolo de pesquisa nº 395/12, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, Protocolo de pesquisa nº 2148/15 (Anexos A e B).

Tabela 3 - Tumores triplo negativos classificados segundo a expressão imuno-histoquímica de *SPARC* e sobrevida selecionados para análise por *cDNA microarray*

CASO	ER	PR	HER2	TNBC	SPARC	SLD	SG	Idade	ST HORM	ST	REC	FUP
562	NEG	NEG	NEG	M132N	88,20	27	32	44	PRÉ	2B	SIM	Ø
641	NEG	NEG	NEG	M255N	89,93	7	12	55	PRÉ	3C	SIM	Ø
634	NEG	NEG	NEG	M248N	66,76	10	27	62	PÓS	3B	SIM	Ø
673	NEG	NEG	NEG	M314N	127,60	128	128	34	PRÉ	3C	NÃO	SED
692	NEG	NEG	NEG	M320N	169,40	112	112	55	PÓS	2B	NÃO	SED
769	NEG	NEG	NEG	M294N	153,62	150	150	45	PRÉ	2A	NÃO	SED

Abreviações: TNBC – triplo negativo; SG – sobrevida global; SLD – sobrevida livre de doença; SPARC – SecretedProteinAcidic and rich in Cystein; ST – estadió; FUP – *followup*; Ø – Óbito; SED – sem evidência de doença; REC – recorrência.

3.2 Análise do perfil de expressão gênica por *cDNA microarray*

Extração de RNA - O RNA total foi extraído das amostras de tumor após pulverização com o auxílio de um Termovac e utilizando-se o kit - *RNeasy Mini Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA) conforme descrito pelo fabricante. A concentração do RNA foi determinada pelo *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (ThermoScientific) e as absorbâncias 260 e 280nm também foram avaliadas, no qual a relação 260/280 ideal apresentou-se entre 1,8 e 2,0. As amostras também foram avaliadas quanto à integridade usando *RNA Nano Chips* em aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent

Technologies Inc., Santa Clara, CA), sendo utilizadas amostras que apresentavam um $RIN \geq 8$.

Amplificação - 200ng de *RNA* purificado pelo *RNasey Mini Kit (Qiagen)*, conforme instrução do fabricante, foi utilizado para realização da etapa de amplificação. Para a etapa de amplificação, os *RNAs* purificados de amostras de tumor e o *RNA* utilizado como referência (*Universal Human Reference RNA – Agilent*) com a adição de *RNA* controle (*Spike-in*) foi realizada utilizando o *Kit Low Input RNA Linear Amplification kit 2-color (GE Healthcare Bio-Scences Corp, Piscataway, NJ, USA)* de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a enzima *T7 RNA Polymerase* foi adicionada com os fluorocromos cianina 5 (Cy-5): como amostra experimental e cianina 3 (Cy-3): como amostra de referência, para etapas de amplificação de *RNAs* complementares antisense (*cRNA*). Após essa etapa os *cRNA* foram purificados pelo *RNasey Mini Kit (Qiagen)* e 825ng de *cRNA* marcados foram hibridizados com as lâminas *Human GE 4X44K V2 (Agilent Technologies)* por 17 horas a 65°C em forno de hibridização para *microarrays*. Então, as lâminas foram lavadas com os tampões *GE Wash Buffer 1* e *GE Wash Buffer 2 (Agilent Technologies)*, conforme protocolo do fabricante. Finalmente, as lâminas foram digitalizadas pelo *Agilent Microarrays Scanner* (Serviço de multiusuário, pertencente ao laboratório de Biologia Molecular do Câncer, na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob responsabilidade do Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira) e a quantificação dos dados e o controle de qualidade foram feitos utilizando o *Agilent Feature Extration (FE) Software*. Os dados extraídos foram importados para o Programa de Análise *Agilent Gene Spring 12.6 - GX*. Os dados discutidos nesta publicação foram depositados no *NCBI gene Expression Omnibus* e estão acessíveis através do GEO Series accession numero GSE98931 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE98931>).

3.3 Construção dos *tissue microarrays* (TMAs).

Foram construídos TMAs no setor de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, em colaboração com o Dr. Victor Piana Andrade e Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório. Para a construção dos microarrays de tecido mamário, uma nova secção foi obtida a partir de um bloco doador representativo de parafina, corados com hematoxilina eosina, e examinados através de um microscópio óptico (Olympus CX 31). Um total de 97 amostras de carcinomas mamários irão compor os TMAs. A área de interesse foi circutada usando-se um marcador permanente. O bloco correspondente de parafina também foi marcado, e foram realizadas biopsias centrais usando um micro arranjador de tecido (*Tissue microarrayer*—Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EUA). Para a construção dos blocos de parafina de TMA, cada amostra foi arranjada uma vez com um núcleo de diâmetro de 1,0 mm espaçados em 0,2 mm entre elas. Os cilindros obtidos serão transferidos de cada bloco doador para um bloco de parafina receptor (bloco de TMA), como podemos visualizar na figura abaixo:

Figura 4 - Esquema demonstrando a montagem do bloco do *tissue microarray* a partir do bloco doador e a lâmina de histologia para a análise.

Os cilindros são localizados em posição bidimensional determinada e mapeados, correspondentes a cada caso (paciente). Um mapa com a identificação detalhada de cada núcleo foi feita em uma planilha de Excel, de modo que cada um dos casos foi identificado com precisão. Após o corte no bloco receptor e sua transferência com lâminas revestidas por uma fita adesiva para posterior reticulação

UV (*Instrumedics Inc, Hackensack, NJ, EUA*), as secções foram mergulhadas numa camada de parafina para evitar a oxidação e mantidas em freezer a -20°C. Os casos foram então retirados do freezer 24 h antes do procedimento de imuno-histoquímica.

3.4 IHQ do Tissue Microarray (TMA)

Foi realizada IHC em três slides (3 núcleos/caso) para cada um dos seguintes marcadores previamente selecionados a partir das listas dos 50 genes mais diferencialmente expressos (positivamente e negativamente regulados), geradas a partir da comparação entre os tumores TNBC-SPARC + vs TNBC-SPARC – : anti-SOHLH2 policlonal de coelho (*Abcam, Cambridge, MA; catalogo ab101402; 1:50*), anti-SPARC (H90) policlonal produzido em cabra (*Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA; catalogo sc-25574; 1:50*), anti-DNAJC12 (N14) policlonal de cabra (*Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA; catalogo sc-104901; 1:50*), anti-CEACAM5 monoclonal produzido em rato (*OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA; catalogo ta-803415*), anti-LIM1 (2D3) monoclonal de rato (*Abcam, Cambridge, MA; catalogo ab131642; 1:300*) e anti-NY-ESO01 (E978) monoclonal produzido em camundongo IgG₁ (*Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA; catalogo sc-53869*), tudo de acordo com as recomendações dos fabricantes. Para imunocoloração, cada slide com TMAs parafinados em secções de 3- μ m de espessura foi mantido numa incubadora a 60°C durante 24 h. As secções foram desparafinizadas e reidratadas usando-se xileno, diluições em série de etanol, e água destilada (100, 85, e 70%, respectivamente). A recuperação antigénica foi realizada através de tampão de citrato de pH 6,0 a 10 mM em um evaporador (Nigro, Eterna 4 1/2 L, Brasil) como previamente descrito por Norton et al.¹⁰³ Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogénio a 3% em solução salina fosfatada e tamponada (PBS) em pH de 7,4 por 5 minutos e lavadas por 3 vezes com PBS. A diluição ideal foi definida utilizando-se amostras positivas bem caracterizados e testadas antes da coloração das lâminas do TMA. As lâminas foram lavadas em PBS e subsequentemente incubadas com anti-IgG biotinilado durante 30 minutos a 37°C, e depois com kit LSAB de estreptavidina-biotina peroxidase (*Dako, Carpinteria, CA, EUA*) numa câmara umidificada. A

imunocoloração foi realizada incubando as lâminas em solução de diaminobenzidina contendo 1 μ L de cromogênio por 50 μ L de substrato tamponado (*Dako*), por 5 minutos. Após o desenvolvimento do cromogênio, os slides foram lavados, desidratados com álcool e xileno, e montados com lamínulas permanentes medias.

3.5 Avaliação imuno-histoquímica (IHQ)

A partir dos blocos de TMA foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4 μ m, previamente tratadas com película aderente especial (*Instrumedics USA*). Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por H&E nos níveis 1, 25, 50, 75 e 100. Em seguida as lâminas obtidas foram submetidas a técnica imuno-histoquímica para cada marcador. A técnica utilizada seguiu os passos tradicionais e rotineiros no laboratório. Para cada marcador foi utilizada a melhor técnica de diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno a ser determinada para cada anticorpo. Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado, e dois controles negativos da reação (retirada do anticorpo primário e retirada do complexo secundário).

A avaliação do resultado do estudo imuno-histoquímico foi feita para cada anticorpo quanto à quantidade em percentual de células coradas e a intensidade da reação. A quantidade de células positivas para um determinado marcador foi dividida entre escores 0 a 4, a saber: 0 – menos do que 1%; 1 – mais do que 1% e menos do que 10%; 2 – mais do que 10% e menos do que 50%; 3 – mais do que 50% e menos do que 90%; e 4 – mais do que 90%. A intensidade da reação será estimada em quatro níveis a saber: 0 – reação negativa; 1 – reação fraca quando comparada ao controle interno; 2 – reação de intensidade moderada; e 3 – reação forte, equivalente ao controle interno. Para fins de análise estatística, os casos poderão ser re-categorizados de acordo com a necessidade e adequação para demonstração dos resultados.

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizadas informações clínicas e anatomopatológicas e de seguimento das pacientes tabuladas no banco de dados do Programa “Statistical Package for Social Science-SPSS for Windows”, versão 20.0. As correlações entre os dados obtidos na análise de expressão e as variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas foram calculados pelo teste Qui-quadrado bi-caudal, corrigido pelo teste de Fischer quando necessário e apresentadas na forma de tabelas de contingência. A análise dos fatores prognósticos foi feita através do estimador de Kaplan-Meier e modelos de riscos proporcionais de Cox. Para comparar as curvas de probabilidade de sobrevida acumulada foi utilizado o teste de log rank, com a hazard ratio (HR) como medida de risco.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise do perfil de expressão gênica

Para a identificação de genes diferencialmente expressos nas comparações entre os tumores triplo negativos com expressão positiva para SPARC (TNBC-SPARC+) e tumores triplo negativos com expressão negativa para SPARC (TNBC-SPARC-), utilizamos o programa *GeneSpring 12.6 - GX*. Foram utilizados os mesmos seis pares de amostras dos casos classificados segundo a expressão de *SPARC* e taxa de sobrevida (baixa expressão – menor sobrevida e alta expressão – alta sobrevida). Utilizando como *cut off* um *fold change* ≥ 3 , identificamos um número significativo de genes diferencialmente expressos. Nas diferentes comparações foram identificados 811 transcritos mais expressos nos tumores TNBC/SPARC+ em relação aos tumores TNBC/SPARC-; Como pode ser observado no Diagrama de Venn, na Figura 5, 2721 genes diferencialmente mais expressos foram comuns na intersecção entre os TNBC/SPARC+ vs células MCF10A com tumores TNBC/SPARC- vs MCF10A; 158 foram comuns entre os tumores TNBC/SPARC+ vs células MCF10A com tumores TNBC/SPARC+ vs tumores TNBC/SPARC-; 297 foram comuns nos TNBC/SPARC- vs células MCF10A com TNBC/SPARC+ vs TNBC/SPARC-, e 194 genes foram comuns em todas as análises comparativas.

Figura 5 - Diagrama de Venn gerado a partir dos genes identificados como diferencialmente expressos nas 3 análises comparativas. Em amarelo a comparação de TNBC/SPARC+ vs células MCF10A; em roxo, a comparação de TNBC/SPARC- vs células MCF10A; em verde, a comparação de TNBC/SPARC+ vs TNBC/SPARC-.

As listas dos 50 genes mais diferencialmente expressos (positivamente e negativamente regulados), geradas a partir da comparação entre os tumores TNBC-SPARC+ vs TNBC-SPARC- estão apresentadas nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - 50 genes mais diferencialmente expressos identificados nas análises de transcriptoma: *SPARC* negativo vs *SPARC* positivo – positivamente regulados

GENE SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGE
<i>SOHLH2</i>	<i>spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2</i>	24,204882
<i>KLHL13</i>	<i>kelch-like family member 13</i>	22,092775
<i>HPGD</i>	<i>hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)</i>	20,013655
<i>GPR158</i>	<i>G protein-coupled receptor 158</i>	18,731873
<i>FABP7</i>	<i>fatty acid binding protein 7, brain</i>	18,304617
<i>CTAG1A</i>	<i>cancer/testis antigen 1A</i>	18,089153
<i>ZNF556</i>	<i>zinc finger protein 556</i>	17,338322
<i>SLC26A4</i>	<i>solute carrier family 26 (anion exchanger), member 4</i>	15,654723
<i>MAGEA1</i>	<i>melanoma antigen family A, 1</i>	14,486642
<i>UGT2B11</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11</i>	14,126801
<i>SLAIN1</i>	<i>SLAIN motif family, member 1</i>	13,437515
<i>C6orf105</i>	<i>androgen-dependent TFPI-regulating protein</i>	13,048012
<i>GSTM2P1</i>	<i>glutathione S-transferase mu 2 (muscle) pseudogene 1</i>	13,04271

Cont/ Tabela 4

GENE SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGE
HS3ST4	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 4	12,577283
CYP26A1	cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	12,559343
TOX3	TOX high mobility group box family member 3	12,524134
FBN2	fibrillin 2	11,52936
FSIP1	fibrous sheath interacting protein 1	11,294454
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	10,637887
ZNF385B	zinc finger protein 385B	10,515692
TDRD9	tudor domain containing 9	9,712016
CHRD2	chordin-like 2	9,67442
CELF4	CUGBP, Elav-like family member 4	9,099181
TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	8,627154
DDC	dopadecarboxylase (aromaticL-aminoaciddecarboxylase)	8,5282955
KIRREL3	kin of IRRE like 3 (Drosophila)	8,311596
FBXW10	F-box and WD repeat domain containing 10	8,196365
GLYATL2	glycine-N-acyltransferase-like 2	8,125769
TRIM36	tripartite motif containing 36	7,9861116
MSMB	microseminoprotein, beta-	7,9680247
ZNF204P	zinc finger protein 204, pseudogene	7,6334887
SEMA3D	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	7,4691854
TSPAN8	tetraspanin 8	7,407979
MUC20	mucin 20, cell surface associated	7,373781
APOD	apolipoprotein D	7,331216
C8orf46	chromosome 8 open reading frame 46	7,3107815
ATPIA2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	7,2574034
MYOM2	myomesin 2	7,0240893
FAM65B	family with sequence similarity 65, member B	6,7824497
CLDN1	claudin 1	6,6860967
RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2	6,6729364
SC5DL	sterol-C5-desaturase	6,5468574
PPM1H	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1H	6,5128794
MAGEC1	melanoma antigen family C, 1	6,265437
MSLN	mesothelin	6,2652154
EAF2	ELL associated factor 2	6,1420712
AMTN	amelotin	6,137903
IGLL5	immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	6,0739875
FAM70A	transmembrane protein 255A	5,9661818
EGF	epidermal growth factor	5,872254

Tabela 5 - 50 genes mais diferencialmente expressos identificados nas análises de transcriptoma: *SPARC* negativo vs *SPARC* positivo – negativamente regulados

GENE SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGE
<i>KRT1</i>	<i>keratin 1</i>	-57,752113
<i>CAPN8</i>	<i>calpain 8</i>	-33,000183
<i>IVL</i>	<i>involucrin</i>	-32,162357
<i>SPRR3</i>	<i>small proline-rich protein 3</i>	-31,538353
<i>SCGB2A2</i>	<i>secretoglobin, family 2A, member 2</i>	-30,474106
<i>SCGB2A1</i>	<i>secretoglobin, family 2A, member 1</i>	-25,592691
<i>LHX1</i>	<i>LIM homeobox 1</i>	-22,50846
<i>CEACAM7</i>	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7</i>	-21,614643
<i>DDTL</i>	<i>D-dopachrometautomerase-like</i>	-21,60275
<i>MESPI</i>	<i>mesoderm posterior basic helix-loop-helix transcription factor 1</i>	-21,198952
<i>CEACAM6</i>	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)</i>	-19,944998
<i>FAM25A</i>	<i>family with sequence similarity 25, member A</i>	-19,129246
<i>PKNOX2</i>	<i>PBX/knotted 1 homeobox 2</i>	-18,78582
<i>CHP2</i>	<i>calcineurin-like EF-hand protein 2</i>	-17,98957
<i>CAMP</i>	<i>cathelicidin antimicrobial peptide</i>	-17,754045
<i>SERPINB4</i>	<i>serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4</i>	-17,092913
<i>SERPINB3</i>	<i>serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3</i>	-16,546053
<i>CAPS</i>	<i>calcyphosine</i>	-14,890156
<i>SCGB1D2</i>	<i>secretoglobin, family 1D, member 2</i>	-14,830367
<i>HS6ST3</i>	<i>heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3</i>	-13,984704
<i>PLA2G4D</i>	<i>phospholipase A2, group IVD (cytosolic)</i>	-13,786746
<i>KRT32</i>	<i>keratin 32</i>	-13,717983
<i>SPINK6</i>	<i>serine peptidase inhibitor, Kazal type 6</i>	-12,225986
<i>HMP19</i>	<i>HMP19 protein</i>	-12,197929
<i>KRTDAP</i>	<i>keratinocyte differentiation-associated protein</i>	-11,971203
<i>HIST2H3A</i>	<i>histone cluster 2, H3a</i>	-11,967605
<i>C9orf169</i>	<i>cysteine-rich tail protein 1</i>	-11,8601675
<i>SIM2</i>	<i>single-minded family bHLH transcription factor 2</i>	-11,852352
<i>DAPL1</i>	<i>death associated protein-like 1</i>	-11,230155
<i>FABP6</i>	<i>fatty acid binding protein 6, ileal</i>	-11,16805
<i>SNORA74A</i>	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 74A</i>	-11,162715
<i>SNORA53</i>	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 53</i>	-11,120716
<i>CEACAM3</i>	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3</i>	-11,062978
<i>DEFB1</i>	<i>defensin, beta 1</i>	-11,032472
<i>SNORA28</i>	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 28</i>	-10,447246
<i>S100A14</i>	<i>S100 calcium binding protein A14</i>	-10,392316
<i>SLURP1</i>	<i>secreted LY6/PLAUR domain containing 1</i>	-10,308109
<i>RGS20</i>	<i>regulator of G-protein signaling 20</i>	-10,228696
<i>CEACAM5</i>	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5</i>	-10,209655
<i>HHIPL2</i>	<i>HHIP-like 2</i>	-10,193
<i>TMEM45A</i>	<i>transmembrane protein 45A</i>	-10,142554
<i>RN7SK</i>	<i>RNA, 7SK small nuclear</i>	-10,115126
<i>DEFB4A</i>	<i>defensin, beta 4A</i>	-9,812836
<i>SNORD3B-1</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 3B-1</i>	-9,756768
<i>CDSN</i>	<i>corneodesmosin</i>	-9,561963
<i>RAET1E</i>	<i>retinoic acid early transcript 1E</i>	-9,540758
<i>PVALB</i>	<i>parvalbumin</i>	-9,488628
<i>DMKN</i>	<i>dermokine</i>	-9,437762
<i>ACOX2</i>	<i>acyl-CoA oxidase 2, branched chain</i>	-9,346732
<i>PCDHB5</i>	<i>protocadherin beta 5</i>	-9,300331

Os genes diferencialmente expressos também foram classificados em relação às funções e processos biológicos dos quais participam, utilizando o Gene Ontology (GO). As representações gráficas da distribuição destes genes segundo a classificação de GO são mostradas nas figuras 6 e 7. Os genes diferencialmente expressos estão envolvidos em diferentes processos biológicos, tais como, processos do sistema imune, processos metabólicos, resposta celular a estímulos químicos, angiogênese, apoptose, adesão celular, com especial destaque aos processos de desenvolvimento celular, comunicação celular e componentes celulares de movimento.

Figura 6 - Distribuição dos transcritos positivamente expressos na comparação TNBC/SPARC - vs TNBC/SPARC + quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.

SPARC Positivo vs Negativo - negativamente regulados

Figura 7 - Distribuição dos transcritos negativamente expressos na comparação TNBC/SPARC - vs TNBC/SPARC + quanto a participação nos processos biológicos, usando termos do Gene Ontology.

Além da classificação dos genes diferencialmente expressos em processos biológicos, avaliamos as relações entre eles. Para isso, foi utilizado o programa IPA-Ingenuity Pathway Analysis® para gerar redes gênicas funcionais a partir da lista dos 50 genes mais diferencialmente expressos identificados nas comparações entre tumores TNBC/SPARC - vs tumores TNBC/SPARC +.

Várias redes gênicas foram geradas, incluindo 5 redes gênicas para a comparação entre os tumores TNBC/SPARC - vs TNBC/SPARC +. Nas figuras que se seguem, estão representadas as duas redes gênicas que mais se destacaram.

SPARC Negativo vs SPARC Positivo

Figura 8 - Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em TNBC/SPARC – vs TNBC/SPARC +. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e da relação biológica entre dois nós é representada como uma malha. A intensidade da cor do nó indica o grau de expressão positiva (vermelho) ou negativa (verde). As malhas descrevem a natureza da relação entre os nós: — interação direta (atua sobre); ----, interação indireta; @auto-regulação.

Em se tratando da rede gênica nos tumores SPARC positivo vs SPARC negativo, representada na figura 8, ressalta-se a expressão positiva do gene *sohlh2*, localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q13.3), cuja principal função é atuar como fator de transcrição envolvido com a espermatogênese e oogênese.

Em outra rede de interação molecular, mostrada na Figura 9, destaque para uma família de genes com expressão negativa chamada CEACAM, sendo que um dos membros, o CEACAM6, ou *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*

6, localizado no cromossomo 19, tem como função primordial a adesão celular. Contudo, observa-se uma interação molecular deste gene em nossa rede de interação molecular, notando-se uma baixa expressão do CEACAM6 e CEACAM5 em nossas amostras, sendo então definida a escolha do CEACAM5 pela relação já descrita nos tumores de mama triplo-negativos com expressão negativa de SPARC, relacionada a quimiossensibilidade em diversos tumores.

SPARC Negativo vs SPARC Positivo

Figura 9 - Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em TNBC/SPARC – vs TNBC/SPARC +. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e da relação biológica entre dois nós é representada como uma malha. A intensidade da cor do nó indica o grau de expressão positiva (vermelho) ou negativa (verde). As malhas descrevem a natureza da relação entre os nós: — interação direta (atua sobre); ---, interação indireta; ⊙ auto-regulação.

Uma tabela com os genes diferencialmente expressos selecionados através de anotação manual, dentre todos os 50 genes mais diferencialmente expressos *up* e *down* regulados das 2 comparações, foi então construída, utilizando-se os dados disponíveis na literatura. Outra ferramenta de auxílio para esta criteriosa seleção está disponível online através do domínio [http:// www.kmplot.com](http://www.kmplot.com) , chamada Kaplan-Meier Plotter, ou KM Plotter, que inclui diversas funcionalidades para um banco de dados capaz de acessar o efeito de 54.675 genes na sobrevida através de 10.461 amostras de câncer, das quais 5.143 são amostras de pacientes com diferentes subtipos de câncer de mama. O objetivo primário desta ferramenta é uma meta-análise baseada na avaliação de biomarcadores. Dentre diversas funcionalidades, é possível fazer a análise específica de um gene, bem como de múltiplos genes, simultaneamente. Todos os 100 genes incluídos em ambas as listas foram verificados um a um no KM Plotter, de forma que através dos resultados demonstrados pelas curvas de sobrevida, associados com a literatura disponível ao qual os genes se relacionam quanto às funções celulares e atuação nos tumores de mama, selecionamos os genes que pudessem apresentar melhor potencial para validação como possíveis novos biomarcadores em tumores triplo-negativos. Em seguida, após a criação de curvas de Kaplan-Meier, também foi possível criar a representação fotográfica dos dados obtidos em diversos formatos. Utilizando-se o primeiro gene em destaque na tabela 4, onde estão listados os 50 genes positivamente regulados na comparação entre tumores triplo-negativos SPARC positivo *vs* tumores SPARC negativo, no programa KM Plotter, o SOHLH2 foi analisado quanto ao impacto na sobrevida livre de doença em 10 anos e na sobrevida global, respectivamente, com curvas específicas de Kaplan-Meier, como mostrado na figura 10, a seguir:

SOHLH2

Figura 10 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene SOHLH2. (A e C) Todos os subtipos; (B e D) Triplo-negativo; Dados gerados utilizando do banco de dados do KM Plotter (<http://www.kmplot.com>).

Utilizando bancos de dados públicos para anotação gênica e a ferramenta KM Plotter, foi possível selecionar os genes de forma mais criteriosa, levando-se em consideração as várias funções biológicas dos diferentes genes envolvidos em proliferação, angiogênese, invasão; além de quimiosensibilidade a drogas. Anticorpos para as proteínas codificadas pelos genes selecionados foram utilizados para a validação por imuno-histoquímica em TMAs (*tissue microarrays*) contendo TNBC.

Com isso, optamos por selecionar 5 genes a serem avaliados: DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A. Nas figuras subsequentes (Figuras 11 a 14), podemos observar pelas curvas de Kaplan-Meier geradas pelo software, como se deu o comportamento dos outros 4 genes quando comparados nos diversos subtipos, assim como especificamente no subtipo triplo-negativo.

DNAJC12

Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene DNAJC12. (A e C) Todos os subtipos; (B e D) Triplo-negativo; Dados gerados utilizando do banco de dados do KM Plotter (<http://www.kmplot.com>).

LIM-1

Figura 12 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene LIM-1. (A e C) Todos os subtipos; (B e D) Triplo-negativo; Dados gerados utilizando do banco de dados do KM Plotter (<http://www.kmplot.com>).

CEACAM5

Figura 13 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene CEACAM5. (A e C) Todos os subtipos; (B e D) Triplo-negativo; Dados gerados utilizando do banco de dados do KM Plotter (<http://www.kmplot.com>).

CTAG1A

Figura 14 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença (A e B) e sobrevida global (C e D) em pacientes com câncer de mama estratificadas de acordo com a expressão dos transcritos do gene CTAG1A. (A e C) Todos os subtipos; (B e D) Triplo-negativo; Dados gerados utilizando do banco de dados do KM Plotter (<http://www.kmplot.com>).

4.2 Avaliação imuno-histoquímica das proteínas SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A em TMAs contendo TNBCs

Após avaliarmos os resultados oferecidos pelo ensaio de cDNA *microarray*, verificamos a lista dos 50 genes mais diferencialmente expressos (*up* e *down* regulados), que foram geradas a partir da comparação entre tumores triplo negativos com expressão de SPARC positiva e expressão de SPARC negativa. Em seguida, os genes diferencialmente expressos também foram classificados em relação às funções e processos biológicos dos quais participam, utilizando-se o *Gene Ontology* (GO), bem como as relações destes genes com as vias de sinalização, ou até mesmo se pertenciam a alguma via descrita em processos de angiogênese, quimiorresistência e transição epitélio-mesênquima. Para isso, foi utilizado o programa IPA- *Ingenuity*® para gerar redes gênicas funcionais a partir da lista dos 50 genes mais diferencialmente expressos identificados na comparação entre tumores triplo negativos com expressão de SPARC negativa e expressão de SPARC positiva. E, finalmente, com o objetivo de avaliar a relação destes genes em possíveis impactos na sobrevida livre de doença e sobrevida global, utilizamos da ferramenta KM PLOT (www.kmplotter.com). Os resultados que foram obtidos e já descritos anteriormente, além de sustentarem a importante relação destes genes com os TNBC, no âmbito de sua expressão, seja “upregulados” ou “downregulados”, tornou possível que investíssemos na validação dos genes em um banco de dados com um número maior de pacientes TNBC, a fim de traduzir robustez e respaldo às nossas indagações. Diante disso, optamos então pela cooperação do Serviço de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center em nos fornecer o material biológico necessário de seu banco de dados e de tumores, onde seriam avaliados os 6 genes selecionados em amostras de tumores triplo negativos de pacientes tratados naquela instituição, em qualquer período, até o ano de 2015. Dessa forma, a partir dos blocos de TMA foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4µm, previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics USA). Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por H&E nos níveis 1, 25, 50, 75 e 100.

Conforme já relatado previamente, os 6 anticorpos foram padronizados sistematicamente de forma supervisionada por técnicos e patologistas do laboratório de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center e, assim que foram disponibilizadas, as leituras dos resultados foram feitas exclusivamente pela mesma patologista, Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório, em conjunto com o doutorando. Após término das leituras e finalização da coleta dos dados clínicos em prontuário médico dos pacientes fornecedores das amostras, foi possível então avaliar os dados, que estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Características anátomo-clínicas das pacientes com tumores triplo-negativos incluídas no ensaio por TMA, para os 6 genes selecionados. Teste do χ^2 corrigido pelo teste exato de Fischer.

Característica	SPARC n=35		DNAJC12 n=39		LIM1 n=39		SOHLH2 total n=35		SOHLH2 cito n=35		SOHLH2 núcleo n=35		CEACAM5 n=18		CTAG1A n=18	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
Idade																
<48	15	04	19	05	03	19	05	14	13	06	06	13	02	06	03	03
>48	06	10	13	02	08	09	00	16	11	05	00	16	01	09	04	08
	p=0.018		NS		p=0.033		p=0.049		NS		p=0.022		NS		NS	
pT																
pT1+pT2	16	13	25	06	10	21	03	26	20	09	04	25	03	13	07	09
pT3+pT4	05	01	07	01	01	07	02	04	04	02	02	04	00	02	00	02
	NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	
pN																
pN0	11	10	17	04	05	15	01	18	13	06	02	17	02	09	05	07
pN+	09	04	15	03	06	12	03	12	10	05	03	12	01	06	02	04
	NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	
Estadio																
I+II	08	08	13	03	05	10	00	14	08	06	01	13	02	09	03	08
III+IV	05	03	13	03	06	13	01	09	05	05	01	09	01	06	04	03
	NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	
Grau Histológico																
I+II	05	01	05	02	04	03	00	05	04	01	00	05	00	03	02	04
III	16	13	27	05	07	25	05	25	20	10	06	24	03	12	05	07
	NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	
Grau nuclear																
II	01	01	03	00	03	00	00	02	02	00	00	02	00	20	02	01
III	19	13	28	07	08	28	05	27	22	10	06	26	03	12	04	10
	NS		NS		p= 0,018		NS		NS		NS		NS		NS	

Para cada anticorpo foram utilizadas duplicatas de amostras de material biológico, de forma que a classificação da imuno-histoquímica respeitou critérios subjetivos de leitura de patologia experiente e exclusiva ao ensaio. Para tanto, em casos em que houve escassez de material, os mesmos foram denominados como “não-avaliáveis”, e descartados da análise estatística subsequente. Por outro lado, em casos corados pelos anticorpos e respeitando-se os padrões da literatura medica e de protocolos de TMA, optou-se pela classificação da colocação, em sua intensidade em 3 níveis: fraco, moderado e intenso. Além disso, de forma subjetiva, a intensidade das colorações também foi graduada em porcentagem, variando-se de 0-100. Com isso, foi possível comparar os dados com as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença das pacientes, geradas pelos dados clínicos coletados em prontuário medico.

Dessa forma, procuramos correlacionar a expressão dos genes deste estudo com pacientes com TNBC com baixa e alta expressão de SPARC. Os dados estão representados nas Tabelas 7 e 8 e nas figuras que se seguem:

Tabela 7 - Dados representativos do comportamento dos anticorpos analisados no ensaio de TMA, para os genes SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A. Teste do χ^2 corrigido pelo teste exato de Fischer.

Característica	SPARC		DNAJC12		LIM1		SOHLH2 total		SOHLH2 cito		SOHLH2 núcleo		CEACAM5		CTAG1A	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
SPARC																
Neg																
Pos																
DNAJC12																
Neg	14	14														
Pos	04	01														
NS																
LIM1																
Neg	05	05	10	01												
Pos	13	06	20	07												
NS			NS													
SOHLH2 total																
Neg	03	03	04	01	00	05										
Pos	23	17	25	03	10	15										
NS																
SOHLH2 cito																
Neg	17	15	22	03	06	16	07	29								
Pos	09	05	07	01	04	04	00	14								
NS																
SOHLH2 núcleo																
Neg	03	04	04	01	00	05	07	01	07	01						
Pos	23	16	25	03	10	15	00	42	29	13						
NS							p<0.0001			NS						
CEACAM5																
Neg	01	02	02	00	01	01	00	03	02	01	00	00				
Pos	09	08	16	01	07	08	00	19	13	06	00	19				
NS																
CTAG1A																
Neg	06	02	07	01	04	02	00	09	07	02	00	09	00	08		
Pos	08	10	12	02	05	09	01	16	11	06	01	16	02	12		
NS																

Tabela 8 - Dados representativos de sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes incluídas no ensaio de TMA, para os genes SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A. Teste do χ^2 corrigido pelo teste exato de Fischer.

Característica	SPARC		DNAJC12		LIM1		SOHLH2 total		SOHLH2 cito		SOHLH2 núcleo		CEACAM5		CTAG1A	
	n=32		n=39		n=38		n=32		n=32		n=32		n=18		n=18	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
Sobrevida Global																
(mediana 80,2m)																
<80,2m	12	04	17	06	03	18	04	13	12	05	04	13	01	06	02	03
>80,2m	07	09	15	01	08	09	01	14	09	06	02	13	02	09	05	08
Chi-Square	NS		NS		p=0.037		NS		NS		NS		NS		NS	
Sobrevida Livre de Doença																
(mediana 79,4m)																
<79,4m	10	04	15	05	04	14	02	13	09	06	03	12	00	07	02	04
>79,4m	07	08	13	01	07	08	01	13	09	05	01	13	03	08	05	07
Chi-square	NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	

4.3 Análise de sobrevivência

Na análise univariada, pacientes com idade < 48 anos apresentaram maior número de eventos, nos TNBC que apresentaram expressão negativa de SPARC e expressões positivas de LIM-1 e SOHLH2, em comparação com aqueles que demonstraram expressão positiva de SPARC e expressões negativas de LIM-1 e SOHLH2 ($p=0.018$; $p= 0.033$; $p=0.049$, respectivamente, teste de log-rank). Além disso, o grau nuclear elevado se mostrou importante como fator prognóstico nos TNBC com expressão positiva de LIM-1 ($p=0.004$, teste de log-rank). Em termos de sobrevida livre de doença, a mediana foi de 79,4 meses, porém nenhum gene atingiu significância estatística. A sobrevida global mediana (80,2 meses; teste exato de Fischer), sendo que os TNBC com expressão negativa de LIM-1 estiveram associados com maior sobrevida global em comparação às amostras com expressão positiva de LIM-1 ($p=0.037$; teste de log-rank).

SPARC

As análises das curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global, relativas ao gene SPARC foram respectivamente ($p=0.163$; $p=0.154$, teste de log-rank). Embora não tenham se mostrado estatisticamente significativas, sugerem uma tendência de melhor evolução em pacientes com TNBC com expressão positiva de SPARC do que em pacientes com TNBC com expressão negativa de SPARC. Durante a leitura dos TMAs, foi possível avaliar os dados de 28 pacientes com material biológico suficiente e adequado para a realização dos experimentos, sendo 17 pacientes com perfil TNBC/SPARC- vs 11 TNBC/SPARC +, sendo que a sobrevida média livre de doença no grupo TNBC/SPARC - foi de 84 meses, enquanto no grupo TNBC/SPARC + foi de 156 meses (IC 95%). Por outro lado, o número de eventos foi baixo em ambos os grupos, sendo 3 recorrências no grupo TNBC/SPARC - e 5 no grupo TNBC/SPARC +. Em relação a sobrevida global destas pacientes, foi possível avaliar os dados de 19 pacientes com perfil TNBC/SPARC- vs 12 TNBC/SPARC +, sendo que a sobrevida média global no grupo TNBC/SPARC - foi de 80 meses, enquanto no grupo TNBC/SPARC + foi de 110 meses (IC 95%).

DNAJC12

As curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global ($p=0.339$; $p=0.237$, respectivamente, teste de log-rank) relativas ao gene DNAJC12, também não atingiram significância estatística. No entanto, 23 amostras foram avaliadas, sendo 20 TNBC/DNAJC12 - e 3 TNBC/DNAJC12 +. A sobrevida média livre de doença no grupo TNBC/DNAJC12 - foi melhor que no grupo TNBC/DNAJC12 +, sendo 91 meses, no primeiro e 28 meses no segundo (IC95%). E isso se repete em relação à sobrevida global média na comparação dos dois subgrupos, de forma que nas amostras de TNBC/DNAJC12 - foram 95 meses, enquanto no grupo TNBC/DNAJC12 + foi de apenas 34 meses.

LIM-1

A estratificação das curvas de Kaplan-Meier para o LIM-1 demonstrou que o grupo TNBC/LIM-1 - apresenta melhor evolução em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global, embora não significante estatisticamente em nossas amostras ($p=0.238$; $p=0.211$, respectivamente, teste de log-rank). Das 21 amostras com possibilidades de avaliação adequada do marcador, 9 foram TNBC/LIM-1 -, enquanto 12 foram TNBC/LIM-1 +. Não há relatos de eventos de recorrência local ou sistêmica no grupo TNBC/LIM-1 -, enquanto 25% recorreram no grupo TNBC/LIM-1 +. Em relação a sobrevida global, das 22 amostras disponíveis, não houve eventos no grupo TNBC/LIM-1 -, enquanto 3 pacientes foram a óbito no grupo TNBC/LIM-1 +.

SOHLH2

As curvas referentes a sobrevida livre de doença e sobrevida global ($p=0.063$; $p=0.058$, respectivamente, teste de log-rank) relativas ao gene SOHLH2, sugerem a ocorrência de eventos de recidiva mais precoces em pacientes com TNBC com expressão positiva de SOHLH2, em comparação ao grupo de pacientes com TNBC com expressão negativa de SOHLH2. Durante a leitura dos TMAs, 16 amostras com perfil TNBC/SOHLH2- vs 10 TNBC/SOHLH2 +, puderam ser avaliadas, sendo que a sobrevida média livre de doença no grupo TNBC/SOHLH2 - foi de 175 meses, enquanto no grupo TNBC/SOHLH2 + foi de 64 meses (IC 95%). Em relação a sobrevida global destas pacientes, a sobrevida média no grupo TNBC/SOHLH2 - foi

de 243 meses, enquanto no grupo TNBC/SOHLH2 + foi de 72 meses (IC 95%), quase 3 vezes menor quando o SOHLH2 esta altamente expresso.

CEACAM5

A estratificação das curvas de Kaplan-Meier para o CEACAM5 demonstrou que o grupo TNBC/CEACAM5 - apresenta melhor evolução em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global, embora sem significância estatística em nossas amostras ($p=0.478$; $p=0.488$, respectivamente, teste de log-rank). Não houve eventos de recorrência no grupo TNBC/CEACAM5 -, enquanto 2 recidivas ocorreram no grupo TNBC/CEACAM5+, em 16 amostras avaliadas. Em relação a sobrevida global, nenhum evento foi detectado no grupo TNBC/CEACAM5 -, enquanto apenas dois óbitos (12.5%) ocorreram no grupo TNBC/CEACAM5 +.

CTAG1A

As curvas referentes a sobrevida livre de doença e sobrevida global não apresentaram significância estatística ($p=0.958$; $p=0.999$, respectivamente, teste de log-rank). No entanto, 17 amostras foram avaliadas, sendo 6 TNBC/CTAG1A - e 11 TNBC/CTAG1A +. A sobrevida média livre de doença no grupo TNBC/CTAG1A - foi de 66 meses, e de 68 meses no grupo TNBC/CTAG1A + (IC95%). Em relação à sobrevida global média, na comparação dos dois subgrupos, aparentemente identifica-se uma evolução pior no grupo TNBC/CTAG1A - (70 meses), enquanto no grupo TNBC/CTAG1A + foi de 78 meses (IC 95%).

SPARC

Figura 15 - Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo SPARC em citoplasma e estroma. Aumento 20x: (A) negativa citoplasma/fraco em estroma; (B) fraco/moderado positiva; (C) moderado/forte positiva;

Figura 16 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC; teste de log-rank (Mantel Cox)

DNAJC12

Figura 17 - Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo DNAJC12 no citoplasma. Aumento 20x: (A) negativa; (B) positiva; (C) positiva;

Figura 18 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de DNAJC12; teste de log-rank (Mantel Cox)

LIM

Figura 19 - Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo LIM no citoplasma. Aumento 20x: (A) negativa; (B) fraco positiva; (C) moderado positiva;

Figura 20 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de LIM-1; teste de log-rank (Mantel Cox)

SOHLH2

Figura 21 - Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo SOHLH2 no citoplasma e núcleo. Aumento 20x: (A) negativa; (B) fraco/moderado positiva; (C) forte/positiva;

Figura 22 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imunohistoquímica de SOHLH2; teste de log-rank (Mantel Cox)

CEACAM5

Figura 23 - Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CEACAM5 no citoplasma. Aumento 20x: (A) negativa; (B) positiva;

Figura 24 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imunohistoquímica de CEACAM5; teste de log-rank (Mantel Cox)

CTAG1A

Figura 25 - Microfotografia. Expressão imuno-histoquímica do anticorpo CTAG1A no citoplasma. Aumento 20x: (A) negativa; (B) fraco positiva; (C) moderado positiva; (D) forte positiva.

Figura 26 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imunohistoquímica de CTAG1A; teste de log-rank (Mantel Cox)

Após a realização das análises das curvas de Kaplan-Meier com os genes selecionados individualmente, foram então feitas análises comparativas das curvas de SPARC, tanto com baixa expressão quanto com alta expressão, relacionados aos outros 5 genes, da mesma forma, com o objetivo de se caracterizar possíveis comportamentos sobre o prognóstico das pacientes, quanto ao nível de expressão genica e suas curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global. Os resultados destas análises comparativas se encontram nas Figuras 27 a 31, que se seguem:

SPARC/SOHLH2

Figura 27 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / SOHLH2; teste de log-rank (Mantel Cox)

SPARC / SOHLH2

Embora não estatisticamente significativas ($p=0.048$, teste de log-rank), as curvas referentes a sobrevida livre de doença nas diversas comparações entre os genes SPARC e SOHLH2, demonstraram que os grupos TNBC SPARC + / SOHLH2 - e TNBC SPARC + / SOHLH2+ não apresentaram eventos de recorrência, enquanto os grupos TNBC SPARC - / SOHLH2 -, TNBC SPARC - / SOHLH2 +, ocorreram 4 eventos. E isso se repete em termos de sobrevida global, onde o grupo TNBC SPARC - / SOHLH2 -, e TNBC SPARC - / SOHLH2 + tiveram melhor evolução, não sendo descrito nenhum caso de óbito no período avaliado do estudo ($p=0.054$, teste de log-rank). Todavia, os grupos TNBC SPARC - / SOHLH2 -, TNBC SPARC - / SOHLH2 +, apresentaram 3 casos de óbito, dentre 18 pacientes avaliadas.

SPARC/CTAG1A

Figura 28 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imunohistoquímica de SPARC / CTAG1A; teste de log-rank (Mantel Cox)

SPARC / CTAG1A

O grupo TNBC SPARC - / CTAG1A + teve a pior evolução em termos de sobrevida livre de doença dentre todos os grupos avaliados nas diferentes combinações dos genes SPARC e CTAG1A, com 40% dos casos apresentando algum tipo de recidiva, embora sem relevância estatística ($p=0.404$, teste de log-rank). Contudo, os grupos TNBC SPARC + / CTAG1A + e TNBC SPARC + CTAG1A-, tiveram comportamento clínico melhor, não sendo relatados eventos de recorrência. Em se tratando de sobrevida global, as curvas de KM nos genes avaliados em suas diferentes combinações revelaram que os grupos TNBC SPARC + / CTAG1A - e TNBC SPARC + / CTAG1A + evoluíram melhor, sem relatos de óbitos, enquanto nos grupos TNBC SPARC - / CTAG1A - e TNBC SPARC - / CTAG1A +, houve 3 eventos em 9 amostras avaliadas.

SPARC/LIM-1

Figura 29 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imunohistoquímica de SPARC / LIM-1; teste de log-rank (Mantel Cox)

SPARC / LIM-1

A estratificação das curvas de Kaplan-Meier para o SPARC / LIM-1 demonstraram que o grupo TNBC SPARC - / LIM-1 - apresenta melhor evolução em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global, embora não tendo atingido significância estatística em nossas amostras ($p=0.458$; $p=0.419$, respectivamente, teste de log-rank). Não houve eventos de recorrência nos grupos TNBC SPARC - / LIM-1 -, TNBC SPARC +/- LIM - e no grupo TNBC SPARC + / LIM +, enquanto 3 recidivas ocorreram no grupo TNBC SPARC - / LIM-1 +. Em relação a sobrevida global, foram 3 óbitos no grupo TNBC SPARC - / LIM-1 +, de forma que não houve nenhum evento nos demais grupos.

SPARC/CEACAM5

Figura 30 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imunohistoquímica de SPARC / CEACAM5; teste de log-rank (Mantel Cox)

SPARC /CEACAM5

Nas 16 amostras avaliadas para os genes SPARC e CEACAM5, as análises comparativas dos genes revelaram que o grupo TNBC SPARC - / CEACAM 5 - não revelou nenhum evento de recorrência no único caso disponível. Já o grupo TNBC SPARC - / CEACAM5 + revelou 2 casos de recorrência em 7 possíveis avaliados no estudo. Quanto aos grupos TNBC SPARC + / CEACAM5-, TNBC SPARC + / CEACAM5 +, não houve eventos de recorrência em 8 possíveis ($p=0.454$, teste de log-rank). Quanto a sobrevida global média ($p = 0.427$, teste de log-rank), os grupos TNBC SPARC - / CEACAM5 -, TNBC SPARC + / CEACAM5 -, TNBC SPARC + / CEACAM 5 + demonstraram boa evolução clínica, sem óbitos relatados até o momento. Entretanto, no grupo TNBC SPARC - / CEACAM5 + e o grupo TNBC SPARC + / CEACAM 5 + foram identificados dois em 7 possíveis.

SPARC/DNAJC12

Figura 31 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com TNBC estratificadas de acordo com a expressão imuno-histoquímica de SPARC / DNAJC12; teste de log-rank (Mantel Cox)

SPARC / DNAJC12

As curvas referentes a sobrevida livre de doença e sobrevida global não apresentaram significância estatística, na avaliação entre os genes SPARC e DNAJC12. No entanto, 23 amostras foram avaliadas, sendo 11 TNBC SPARC - / DNAJC12 -, 3 TNBC SPARC - / DNAJC12 +, 9 TNBC SPARC + / DNAJC12 -. A sobrevida livre de doença foi pior nos grupos TNBC SPARC - / DNAJC12 -, TNBC SPARC - / DNAJC12 +, sendo identificados 3 casos de recidiva. Em se tratando das curvas de sobrevida global, o grupo TNBC SPARC - / DNAJC12 + apresentou uma sobrevida pior em relação aos outros grupos, sendo identificado 1 óbito nas amostras avaliadas, enquanto o grupo TNBC SPARC - / DNAJC 12 -, apresentou 2 óbitos em 13 amostras avaliadas. Já o grupo TNBC SPARC + / DNAJC12 – obteve melhor evolução clínica, não sendo identificado nenhum caso de óbito.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Tumores de mama triplo negativo (TNBC) representam um subtipo único de câncer de mama, sendo geralmente, desde o seu início, um indicativo de pior prognóstico¹⁰⁴. Neste estudo, analisamos a expressão da proteína SPARC em amostras de câncer de mama do subtipo triplo-negativo.

Para a avaliação do perfil de expressão gênica dos TNBC com expressão de SPARC positiva e expressão de SPARC negativa, buscamos identificar genes relacionados com angiogênese, transição epitélio-mesênquima (TEM), infiltrado linfocitário estromal, ciclo celular, dentre outras funções que vêm sendo descritas na literatura quanto ao comportamento deste subtipo de tumor⁹⁸⁻¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Dentro desse cenário, o gene *Sohlh2* (*Spermatogenesis and oogenesis basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor 2*), se destacou como *up* regulado nas redes gênicas geradas. Proteínas bHLH são uma superfamília de fatores de transcrição que desempenham papéis críticos em muitos processos fisiológicos, incluindo a diferenciação celular, a interrupção do ciclo celular e apoptose¹⁰⁸. Dados da literatura mostraram que o *Sohlh2* está altamente expresso nos tecidos humanos normais, porém, em muitas linhagens celulares de neoplasias malignas, foi observado um nível baixo do *Sohlh2*, sugerindo um possível papel na tumorigênese. A alta expressão de *Sohlh2* é observada em muitos tecidos normais, especialmente em tecidos epiteliais, enquanto o baixo nível de expressão de *Sohlh2* foi detectado em muitas linhagens celulares de câncer¹⁰⁹.

A exemplo dos tumores epiteliais de ovário, onde os baixos níveis de expressão de SOHLH2 se relacionaram com maior atividade de ciclina D1, e consequentemente, com pior prognóstico¹¹⁰, nossos resultados se mostraram semelhantes em se tratando de TNBC, nos quais foi possível perceber que quando há baixos níveis de expressão de SOHLH2, verifica-se uma pior evolução clínica, enquanto em tumores que expressaram níveis elevados de SOHLH2, evidenciou-se melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global, descrito na figuras 22, reforçando ainda mais o conceito de supressor tumoral a este gene. Em se tratando de tumores de mama, os baixos níveis de expressão do SOHLH2 foram encontrados nos espécimes envolvendo 77 casos de

pacientes com carcinoma ductal invasivo tiveram forte relação com doença metastática, evidenciado pela comparação por imuno-histoquímica. Por outro lado, a alta expressão do SOHLH2 em células MDA-MB-231 diminuiu de forma significativa os níveis de marcadores mesenquimais (N-caderina, fibronectina e vimentina). Além disso, houve correlação dos níveis de expressão dos mRNAs do biomarcador da transição epitélio-mesênquima (TEM) com os níveis correspondentes de proteína, sugerindo que o *Sohlh2* possa regular os níveis de expressão desses biomarcadores¹¹¹. Embora não se tenha mostrado estatisticamente significativo nos ensaios de TMA deste estudo, é possível perceber de forma clara uma tendência oposta da influência do SOHLH2 em termos prognósticos aos pacientes com TNBC, demonstrando que a expressão positiva do SOHLH2 se relacionou com a ocorrência de eventos de recidiva mais precoces, em comparação ao grupo de pacientes com TNBC com expressão negativa de SOHLH2. Isso ficou evidente pela pior sobrevida livre de doença e pior sobrevida global, como descrito nas curvas representadas na figura 27, nos casos em que foi possível avaliar o material biológico.

Outro gene que se destacou em nossas análises foi DNAJC12, também chamado de JDP1, J domain containing protein), localizado no cromossomo 10q22.1, um membro da família de proteínas de baixo peso molecular de choque térmico (DnaJ / Hsp40), que tem uma atividade essencial co-chaperona com outras proteínas de choque térmico¹¹². Tais proteínas estão expressas em vários tecidos e atuam no transporte, na iniciação da tradução e na expressão gênica. Através da utilização de 72 amostras de tumores de mama e 20 amostras de tecido normal, Bessa et al.¹¹³ buscaram avaliar o possível papel desempenhado pelo JDP1 no câncer de mama, com a investigação dos níveis de expressão das transcrições em JDP1 numa série de tumores de mama primário, utilizando-se de reação de PCR em tempo real quantitativa (qPCR), tendo encontrado uma relação entre os níveis de expressão de mRNA de JDP1 com o status dos receptores de estrogênio e progesterona, de forma que baixos níveis de expressão do gene se relacionaram com o grupo de tumores de receptores hormonais negativos. De acordo com nossos resultados, a alta expressão de DNAJC12 nos TNBC com alto nível de expressão de SPARC e a direta correlação com melhor sobrevida livre de doença corroboram seu possível conceito de fator de bom prognóstico quando mais expresso em TNBC. Quanto aos resultados apresentados após a análise das

leituras de TMA com o DNAJC12, a alta expressão se relacionou com pior sobrevida livre de doença e pior sobrevida global. Pelo fato do DNAJC12 ser um gene alvo do estrogênio, é possível que a ausência de receptores hormonais possa interferir em sua atividade. Além disso, na comparação entre os grupos foi possível perceber que nas amostras com expressão positiva de SPARC, foi identificada uma melhor evolução clínica das pacientes, de forma que a expressão negativa do DNAJC12, neste cenário, contribui possivelmente a um melhor prognóstico.

Proteínas da família LIM (LMO 1-4) estão emergindo como moléculas-chave em uma ampla variedade de tumores malignos em humanos. Em particular, todos os membros, que são necessários para diversos processos de desenvolvimento, estão implicados no início ou na progressão de vários tipos de neoplasias, incluindo leucemia de células T, câncer de mama e neuroblastoma¹¹⁴. Estas pequenas proteínas contêm dois domínios, e que parecem funcionar por meio de nucleação da formação de novos complexos de transcrição e / ou interrompendo complexos transcricionais existentes para modular os programas de expressão de genes¹¹⁴. Há indícios de que o gene atue na motilidade celular, porem os mecanismos envolvidos na indução da motilidade celular, no crescimento tumoral, angiogênese e invasão ainda são pouco compreendidos. Contudo, a alta expressão de LIM em células de câncer de mama parece estar ligada com angiogênese e maior presença de metástases, sugerindo um comportamento de *oncogene* nesse tipo de tumor¹¹⁵.

Alguns estudos já demonstraram que o LMO4 esta altamente expresso em pacientes com cancer de mama e há direta associação com pior prognostico¹¹⁶⁻¹¹⁸. Em câncer de mama, sugere-se que a expressão de LMO4 relacione-se inversamente com o receptor de estrogênio alfa (RE alfa)¹¹⁹. Um possível mecanismo que possa estar associado a esse comportamento biológico foi descrito por Singh et al.¹²⁰ demonstrando que a alta expressão de genes da família LIM funcionam como repressores RE alfa, estando ligado não apenas a este receptor, mas também ao seu co-repressor, antígeno de metástase tumoral 1 (MTA1). Eles demonstraram que o silenciamento do LIM resultou no aumento da expressão dos genes reguladores do RE alfa. Consequentemente, como o LIM está altamente expresso em tumores de mama, fenótipos negativos para RE alfa podem estar relacionados a progressão e maior

agressividade tumoral. Por outro lado, tumores que apresentam baixos níveis de expressão de LMO4 mostram-se com altos níveis de expressão do HER-2.¹²¹

Nas análises das leituras de TMA relacionadas ao LIM, as curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global corroboram os dados já evidenciados nas análises prévias pelas diversas metodologias realizadas progressivamente, de tal forma que fica clara a tendência de um comportamento biológico mais agressivo em TNBC com alta expressão do LIM, principalmente quando relacionado a tumores que também apresentam baixa expressão de SPARC. Em se tratando de recorrência, a alta expressão de LIM correlacionou-se com maior número de eventos locais e sistêmicos, embora não atingindo significância estatística, em comparação com a baixa expressão de LIM. Além disso, destaca-se em nossos resultados a pior sobrevida global de pacientes com alto nível de expressão do LIM, descrito na figura 20.

Nos TNBC com baixa expressão de SPARC, o LIM correlacionou-se com pior evolução clínica e isso parece ser suportado pela sua relação direta com processos de invasão celular e angiogênese. Portanto, talvez a inibição do LMO4 possa ser útil no tratamento de TNBC, os quais não apresentam até o momento opções terapêuticas específicas, como em outros subtipos de câncer de mama, principalmente naqueles que apresentam SPARC + / LIM -.

Poucos estudos até o momento exploraram o padrão de expressão em câncer de mama de um gene que se mostrou importante em nossos resultados: o cancer testis antigen 1A (CTAG1A)¹²²⁻¹²³. Também conhecido como NY-ESO1, está localizado no cromossomo X, e embora tenha sido descrito seu possível envolvimento com recombinação cromossômica, transcrição, tradução e sinalização celular, sua função fisiológica ainda é pouco conhecida.

As proteínas CTAG1A são frequentemente imunogênicas em pacientes com câncer e, portanto, são considerados importantes alvos para imunoterápicos¹²⁴. Utilizando-se de conjuntos de dados de expressão genética disponíveis publicamente para investigar a expressão de CTAG1A em câncer de mama, embora uma minoria de casos expressou os genes, notou-se uma expressão mais acentuada em tumores com receptores hormonais (RH) negativos¹²⁵. Estudos realizados com imuno-histoquímica confirmaram a associação da expressão do antígeno do CTAG1A com tumores de mama RH negativos, assim como em tumores com alto grau nuclear¹²⁵⁻¹²⁶.

Coombes et al.¹²⁷ investigou a relação entre a expressão de CTAG1A e o subsequente desenvolvimento de câncer de mama infiltrativo, de forma que os resultados mostraram que a falta de expressão de CTAG1A conferiu um risco maior de evolução para doença invasora. Além disso, os autores referem que o CTAG1A esteve expresso em uma alta proporção nos carcinomas ductais in situ, especialmente aqueles que eram RE negativos. A associação significativa da relação entre a expressão de CTAG1A e a menor progressão para doença invasiva podem estar relacionadas a capacidade do sistema imunológico em detectar as células anormais e não necessariamente destruí-las, mas sim, removê-las em estágios iniciais da doença. Embora o CTAG1A esteja expresso num número restrito de pacientes RE negativos, foi constatado que sua alta expressão confere um melhor prognóstico em TNBC¹²⁸. Tais observações demonstram que células de câncer de mama com expressão do CTAG1A possam ser realmente detectadas pelo sistema imunológico, bloqueando então a progressão da doença¹²⁹.

Nossos resultados também são corroborados por Grigorladi et al.¹²², em estudo que envolveu uma análise abrangente da expressão antigênica da família cancer testis em tumores primários de mama com receptores hormonais negativos, alguns com fenótipo basal. Avaliando-se os resultados do TMA em que o CTAG1A esteve envolvido, mesmo que de forma não significativa do ponto de vista estatístico, pôde ser verificada a mesma tendência observada nos estudos já citados anteriormente. Apenas nos casos de TNBC em que a expressão de SPARC foi negativa, pôde ser evidenciada pior evolução clínica, enquanto em TNBC com alta expressão de SPARC, com altos níveis de expressão do CTAG1A, foi observada uma melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global¹³⁰.

Dessa forma, seu potencial antigênico característico e sua expressão peculiar tem trazido oportunidades de pesquisas para um potencial uso como vacinas terapêuticas em diversos tipos de tumores, tais como pulmão, ovários e melanoma, que já possuem estudos em andamento¹²⁴⁻¹²⁹⁻¹³¹.

Em destaque na rede gênica deste estudo, destaca-se a família de genes CEACAM, incluindo genes responsáveis por codificar glicoproteínas de superfície celular, além de funcionar como biomarcadores conhecidos para tumores gastrointestinais. Porém, diversos estudos também descrevem níveis de expressão em

outros tumores, incluindo o trato respiratório, sistema genitourinário e câncer de mama. Dentre suas funções, destaca-se a adesão e diferenciação celular, bem como participação no processo de apoptose¹³².

Nos TNBC com expressão negativa de SPARC, optamos por melhor caracterizar a atividade do CEACAM5, devido a sua relação já bastante descrita com quimiossensibilidade, em diversos tumores¹³³. Segundo Soeth et al.¹³⁴ o CEACAM5 foi associado com a quimiossensibilidade das células tumorais, de forma que ele atue protegendo células tumorais do trato gastro-intestinal de vários estímulos apoptóticos, como o tratamento com 5-fluorouracil. Ainda dentro do conceito de atuação na sensibilidade as drogas quimioterápicas, o CEACAM5 pode aumentar os efeitos terapêuticos de dois medicamentos citotóxicos usados frequentemente na terapia de câncer colorretal, tanto nas células tumorais quanto metastáticas, bem como em tumores de tireóide, inibindo o crescimento celular. Uma explicação pode ser o bloqueio na adesão de anticorpos e, assim, quimiossensibilizar as células tumorais¹³⁵⁻¹³⁶.

De acordo com nossos resultados, genes da família CEACAM se mostraram com baixa expressão, e optamos pela verificação mais detalhada do CEACAM5. Em estudo envolvendo 45 amostras de câncer de mama, onde 30 eram carcinomas ductais invasivos, 8 papilares, 4 lobulares, e 3 tumores phyllodes, a mais alta expressão de CEACAM5 foi encontrada em amostras de lesões papilares, embora a diferença entre carcinomas ductais e lobulares não foi estatisticamente significativa. Em tumores Phyllodes, que possuem um componente estromal exacerbado, geralmente benigno, não foram constatados níveis altos de expressão do CEACAM5¹³⁵. Em tumores com predomínio de componente estromal, como os TNBC, a baixa expressão da CEACAM5 em nossos resultados remontam a possível relação de seu envolvimento com tumores de características mais agressivas e pior prognóstico, quando comparados aos outros subtipos de câncer de mama. Dessa forma, na correlação destes resultados com as leituras fornecidas pelo ensaio de TMA, esperávamos que nos tumores com alta expressão de CEACAM5 evidenciássemos curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global com comportamento biológico melhor. Entretanto, mesmo que de forma não estatisticamente significativa, verificamos o inverso, em que a alta expressão do CEACAM5 correlacionou-se a evolução clínica pior das pacientes

avaliadas, nas curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global ($p=0.478$; $p=0.488$, respectivamente), não sendo possível uma boa correlação com os níveis de expressão de SPARC.

Levando-se em consideração nosso objetivo, em comparar TNBC com expressão positiva do gene SPARC e TNBC com expressão negativa do gene SPARC, utilizando-se da metodologia de cDNA *microarray* e posteriormente, com a seleção de genes candidatos a validação em plataforma de tissue *microarray* (TMA), foi então possível verificar e pontuar diversas características que possam favorecer uma separação mais adequada dentro deste subtipo de tumor, assim como já foi realizado por outros autores. Alguns estudos demonstraram que a expressão elevada de SPARC está associada a tumores pequenos, ao baixo grau nuclear e à alta expressão de RE (todos os $p<0,0001$), que são todas características de tumores de crescimento lento e baixa proliferação¹⁰²⁻¹³⁷. Especificamente em relação ao grau nuclear, os dados não foram significativos do ponto de vista estatístico para o SPARC, mas foram para TNBC com expressão positiva para LIM-1 ($p=0.004$; teste de log-rank), onde tumores de alto grau nuclear tiveram prognóstico pior. E isso provavelmente se deve à sua relação direta com processos de invasão celular e angiogênese¹³⁸.

A disseminação de células cancerosas de um sítio primário para um local distante, é um processo muito complexo, envolvendo múltiplas alterações que se iniciam com o aumento da motilidade celular até a neovascularização. Um passo essencial requer a degradação da matriz extracelular (ECM) permitindo que as células tumorais invadam o tecido adjacente e difundam-se no sangue e vasos linfáticos¹³⁹. Este processo é influenciado por numerosos genes relacionados principalmente com motilidade, adesão celular e também por metaloproteínases de matriz celular. Portanto, talvez a inibição do LIM-1 possa ser útil no tratamento de TNBC, os quais apresentam alto grau nuclear, na maioria dos casos, e que até o momento não apresentam opções terapêuticas específicas, como em outros subtipos de câncer de mama.

Uma limitação relativa do nosso estudo é que o número de amostras com material biológico avaliável disponíveis, principalmente em relação a validação dos resultados por TMA, foi relativamente pequeno. Infelizmente uma parte das amostras já não continha material suficiente para a análise dos anticorpos, perdendo-se a possibilidade de correlacioná-los com os dados clínicos previamente coletados e

disponíveis para análise. Entretanto, nossos resultados reforçam o importante papel biológico do SPARC nos TNBC. Além disso, a expressão de CTAG1A, LIM-1 e DNAJC12 podem fornecer caminhos para uma melhor seleção destes tumores, em termos de agressividade da doença, sendo promissores a novos biomarcadores preditivos especialmente nos TNBC.

A estratificação dos TNBC através de subtipos moleculares ou alterações genômicas específicas, que incluam critérios para definição de agressividade e prognóstico, permitirão uma melhor abordagem individualizada aos pacientes com tratamentos mais eficazes, tornando disponíveis novos medicamentos alvos moleculares e vacinas que inibam os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença, ampliando-se assim as opções terapêuticas, que hoje se restringem aos quimioterápicos, seja no cenário neoadjuvante e adjuvante, bem como metastático.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1 Utilizando a técnica de transcriptoma, foi possível identificar diversos genes como diferencialmente expressos nas amostras de TNBC / SPARC positivo vs TNBC / SPARC negativo;
- 2 A expressão dos marcadores SPARC, DNAJC12, LIM-1, SOHLH2, CEACAM5 e CTAG1A, mostraram-se importantes nos TNBC, tendo alguma influencia no comportamento clínico da doença;
- 3 SOHLH2, DNAJC12 e LIM-1 foram identificados como potenciais novos biomarcadores prognósticos para análise de tumores de mama triplo-negativos.
- 4 Nossas análises podem fornecer biomarcadores com potencial em selecionar pacientes para concepção de ensaios clínicos envolvendo TNBC, para melhor avaliação prognóstica da doença, e preditiva de resposta a novos tratamentos.

7 ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **28/11/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **395/12** intitulado: **“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS COM DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DE SPARC”** apresentado pelo **Departamento de RADIOLOGIA E ONCOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Maria Aparecida Nagai

Pesquisador (a) Executante: Paulo Roberto de Alcantara Filho

CEP-FMUSP, 28 de Novembro de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 17 de dezembro de 2015.

À
Dra. Maria Aparecida Nagai

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2148/15
“Identificação e Caracterização de Novos Biomarcadores em Câncer de Mama”.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, **aprova** **“ad referendum”** a realização do projeto e tomou conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Comprometimento da Instituição Co-participante;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Parecer Consubstanciado de Aprovação do estudo na Instituição Proponente (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP);
- Carta de Aprovação do projeto na Instituição Proponente (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP).

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,

(Dr. Jefferson Luiz Gross)
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. IARC CancerBase. 2013.
3. INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015, 122p. RIO DE JANEIRO: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância; 2015. p. 122.
4. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52(1):108-18.
5. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):e95-e102.
6. Arvold ND, Taghian AG, Niemierko A, Abi Raad RF, Sreedhara M, Nguyen PL, et al. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(29):3885-91.
7. Liedke PE, Finkelstein DM, Szymonifka J, Barrios CH, Chavarri-Guerra Y, Bines J, et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(1):126-33.
8. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol*. 1992;10(4):599-605.
9. Clark GM. Interpreting and integrating risk factors for patients with primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001(30):17-21.
10. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):305-19.
11. Carlson GW, Wood WC. Management of axillary lymph node metastasis in breast cancer: making progress. *JAMA*. 2011;305(6):606-7.
12. Fisher B, Wolmark N, Bauer M, Redmond C, Gebhardt M. The accuracy of clinical nodal staging and of limited axillary dissection as a determinant of histologic nodal status in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet*. 1981;152(6):765-72.
13. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2011;305(6):569-75.
14. Jay R. Harris MM, Marc E. Lippman, C. Kent Osborne. *Diseases of the Breast*. 4 ed. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2010. 1174 p.
15. Leclercq G, Heuson JC, Schoenfeld R, Matthei WH, Tagnon HJ. Estrogen receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 1973;9(9):665-73.

16. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011;378(9805):1812-23.
17. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
18. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
19. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64(9):3037-45.
20. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R65.
21. Zhang Y, Mo M, Li JW, Zhou Y, Wu J, Yu KD, et al. Better predictive value of axillary lymph node (ALN) status after systemic therapy for operable HER2-overexpressing breast cancer: A single-institution retrospective study. *Eur J Surg Oncol*. 2016;42(8):1146-52.
22. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009;41(1):40-7.
23. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
24. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010;23 Suppl 2:S60-4.
25. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68.
26. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
27. Rakha E, Ellis I, Reis-Filho J. Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):618; author reply -9.
28. Ricciardi GR, Adamo B, Ieni A, Licata L, Cardia R, Ferraro G, et al. Androgen Receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as Emerging Targets and Novel Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Patients. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128368.
29. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-67.
30. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1938-48.
31. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *The oncologist*. 2011;16 Suppl 1:1-11.
32. Amirikia KC, Mills P, Bush J, Newman LA. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American

- women : Implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer*. 2011;117(12):2747-53.
33. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012;118(22):5463-72.
 34. Yang WT, Dryden M, Broglio K, Gilcrease M, Dawood S, Dempsey PJ, et al. Mammographic features of triple receptor-negative primary breast cancers in young premenopausal women. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111(3):405-10.
 35. Dogan BE, Gonzalez-Angulo AM, Gilcrease M, Dryden MJ, Yang WT. Multimodality imaging of triple receptor-negative tumors with mammography, ultrasound, and MRI. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194(4):1160-6.
 36. Krizmanich-Conniff KM, Paramagul C, Patterson SK, Helvie MA, Roubidoux MA, Myles JD, et al. Triple receptor-negative breast cancer: imaging and clinical characteristics. *AJR Am J Roentgenol*. 2012;199(2):458-64.
 37. Noh JM, Choi DH, Huh SJ, Park W, Yang JH, Nam SJ, et al. Patterns of recurrence after breast-conserving treatment for early stage breast cancer by molecular subtype. *Journal of breast cancer*. 2011;14(1):46-51.
 38. Steward L, Conant L, Gao F, Margenthaler JA. Predictive factors and patterns of recurrence in patients with triple negative breast cancer. *Annals of surgical oncology*. 2014;21(7):2165-71.
 39. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(3):250-63.
 40. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007;9(5):R65.
 41. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(1):123-39.
 42. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(3):411-22.
 43. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):404; author reply 5.
 44. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007;109(9):1721-8.
 45. Colleoni M, Cole BF, Viale G, Regan MM, Price KN, Maiorano E, et al. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):2966-73.
 46. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on

- pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015;33(1):13-21.
47. Prat A, Fan C, Fernandez A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med*. 2015;13:303.
 48. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(7):1145-53.
 49. Kulkarni N, Pezzi CM, Greif JM, Suzanne Klimberg V, Bailey L, Korourian S, et al. Rare breast cancer: 933 adenoid cystic carcinomas from the National Cancer Data Base. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(7):2236-41.
 50. Lehmann BD, Pietenpol JA, Tan AR. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:e31-9.
 51. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(23):6380-8.
 52. Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Res*. 2010;12 Suppl 4:S5.
 53. Criscitiello C, Azim HA, Jr., Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 6:vi13-8.
 54. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2302-10.
 55. Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol*. 2004;202(1):5-13.
 56. Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, Coates AS, Viale G, Ohlschlegel C, et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(11):2843-51.
 57. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;117(2):273-80.
 58. Treitl D, Radkani P, Rizer M, El Hussein S, Paramo JC, Mesko TW. Adenoid cystic carcinoma of the breast, 20 years of experience in a single center with review of literature. *Breast Cancer*. 2017.
 59. Fostira F, Tsitlaidou M, Papadimitriou C, Pertesi M, Timotheadou E, Stavropoulou AV, et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(1):353-62.
 60. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2568-81.
 61. Milioli HH, Tishchenko I, Riveros C, Berretta R, Moscato P. Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):19.

62. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
63. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(19):1482-5.
64. Krammer J, Pinker-Domenig K, Robson ME, Gonen M, Bernard-Davila B, Morris EA, et al. Breast cancer detection and tumor characteristics in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;163(3):565-71.
65. Greenup R, Buchanan A, Lorzio W, Rhoads K, Chan S, Leedom T, et al. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(10):3254-8.
66. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005;11(14):5175-80.
67. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2147-59.
68. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275-81.
69. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Gronwald J, Zuziak D, Cybulski C, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(2):359-63.
70. Guestini F, McNamara KM, Ishida T, Sasano H. Triple negative breast cancer chemosensitivity and chemoresistance: current advances in biomarkers identification. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(6):705-20.
71. Tai IT, Dai M, Owen DA, Chen LB. Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1492-502.
72. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015;121(1):8-16.
73. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. 2002;70(9-10):537-46.
74. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol*. 2004;164(4):1131-9.
75. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003;33(1):49-54.
76. Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer*. 2002;38(18):2362-70.
77. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. 1981;26(1 Pt 1):99-105.

78. Chong HC, Tan CK, Huang RL, Tan NS. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *Journal of oncology*. 2012;2012:351089.
79. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(5):608-16.
80. Salonen J, Domenicucci C, Goldberg HA, Sodek J. Immunohistochemical localization of SPARC (osteonectin) and denatured collagen and their relationship to remodelling in rat dental tissues. *Arch Oral Biol*. 1990;35(5):337-46.
81. Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol*. 1993;121(6):1433-44.
82. Nagaraju GP, Sharma D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. *Cancer treatment reviews*. 2011;37(7):559-66.
83. Chlenski A, Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Seminars in cell & developmental biology*. 2010;21(1):55-65.
84. Tai IT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat*. 2008;11(6):231-46.
85. Arnold SA, Brekken RA. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *Journal of cell communication and signaling*. 2009;3(3-4):255-73.
86. Menon PM, Gutierrez JA, Rempel SA. A study of SPARC and vitronectin localization and expression in pediatric and adult gliomas: high SPARC secretion correlates with decreased migration on vitronectin. *Int J Oncol*. 2000;17(4):683-93.
87. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXCR4 chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6(1):102-11.
88. Said N, Motamed K. Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis. *Am J Pathol*. 2005;167(6):1739-52.
89. Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol*. 2001;159(2):609-22.
90. Rahman M, Chan AP, Tai IT. A peptide of SPARC interferes with the interaction between caspase8 and Bcl2 to resensitize chemoresistant tumors and enhance their regression in vivo. *PLoS One*. 2011;6(11):e26390.
91. Tang MJ, Tai IT. A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem*. 2007;282(47):34457-67.
92. Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol*. 1995;146(1):95-100.
93. Dhanesuan N, Sharp JA, Blick T, Price JT, Thompson EW. Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;75(1):73-85.
94. Lien HC, Hsiao YH, Lin YS, Yao YT, Juan HF, Kuo WH, et al. Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2007;26(57):7859-71.

95. Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(8):791-800.
96. Wong SY, Crowley D, Bronson RT, Hynes RO. Analyses of the role of endogenous SPARC in mouse models of prostate and breast cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(2):109-18.
97. Barth PJ, Moll R, Ramaswamy A. Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch*. 2005;446(5):532-6.
98. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. 2008;214(3):357-67.
99. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol*. 2007;8(8):R157.
100. Comen E, Davids M, Kirchhoff T, Hudis C, Offit K, Robson M. Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to "triple-negative" breast cancer in Ashkenazi Women. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(1):185-90.
101. Smid M, Dorssers LC, Jenster G. Venn Mapping: clustering of heterologous microarray data based on the number of co-occurring differentially expressed genes. *Bioinformatics*. 2003;19(16):2065-71.
102. Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JH, Nonogaki S, Rierger RB, Netto MM, et al. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(1):1-14.
103. Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol*. 1994;173(4):371-9.
104. Sasaki Y, Tsuda H. Clinicopathological characteristics of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer*. 2009;16(4):254-9.
105. Blick T, Hugo H, Widodo E, Waltham M, Pinto C, Mani SA, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi)/CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(2):235-52.
106. Endres M, Kneitz S, Orth MF, Perera RK, Zerneck A, Butt E. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) expression and secretion in MDA-MB-231 breast cancer cells by LIM and SH3 protein 1 (LASP1). *Oncotarget*. 2016.
107. Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology*. 2012;60(6B):E87-95.
108. Sun H, Ghaffari S, Taneja R. bHLH-Orange Transcription Factors in Development and Cancer. *Transl Oncogenomics*. 2007;2:107-20.
109. Lusk M, Kapushesky M, Nikkila J, Parkinson H, Goncalves A, Huber W, et al. A global map of human gene expression. *Nat Biotechnol*. 2010;28(4):322-4.
110. Zhang H, Zhang X, Ji S, Hao C, Mu Y, Sun J, et al. Sohlh2 inhibits ovarian cancer cell proliferation by upregulation of p21 and downregulation of cyclin D1. *Carcinogenesis*. 2014;35(8):1863-71.
111. Ji S, Zhang W, Zhang X, Hao C, Hao A, Gao Q, et al. Sohlh2 suppresses epithelial to mesenchymal transition in breast cancer via downregulation of IL-8. *Oncotarget*. 2016;7(31):49411-24.

112. Lee J, Hahn Y, Yun JH, Mita K, Chung JH. Characterization of JDP genes, an evolutionarily conserved J domain-only protein family, from human and moths. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1491(1-3):355-63.
113. De Bessa SA, Salaorni S, Patrao DF, Neto MM, Brentani MM, Nagai MA. JDP1 (DNAJC12/Hsp40) expression in breast cancer and its association with estrogen receptor status. *Int J Mol Med*. 2006;17(2):363-7.
114. Matthews JM, Lester K, Joseph S, Curtis DJ. LIM-domain-only proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(2):111-22.
115. Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, Kumar R. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer*. 2006;118(11):2703-10.
116. Montanez-Wiscovich ME, Shelton MD, Seachrist DD, Lozada KL, Johnson E, Miedler JD, et al. Aberrant expression of LMO4 induces centrosome amplification and mitotic spindle abnormalities in breast cancer cells. *J Pathol*. 2010;222(3):271-81.
117. Sum EY, Segara D, Duscio B, Bath ML, Field AS, Sutherland RL, et al. Overexpression of LMO4 induces mammary hyperplasia, promotes cell invasion, and is a predictor of poor outcome in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(21):7659-64.
118. Visvader JE, Venter D, Hahn K, Santamaria M, Sum EY, O'Reilly L, et al. The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14452-7.
119. Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res*. 2001;61(16):5979-84.
120. Singh RR, Barnes CJ, Talukder AH, Fuqua SA, Kumar R. Negative regulation of estrogen receptor alpha transactivation functions by LIM domain only 4 protein. *Cancer Res*. 2005;65(22):10594-601.
121. Montanez-Wiscovich ME, Seachrist DD, Landis MD, Visvader J, Andersen B, Keri RA. LMO4 is an essential mediator of ErbB2/HER2/Neu-induced breast cancer cell cycle progression. *Oncogene*. 2009;28(41):3608-18.
122. Grigoriadis A, Caballero OL, Hoek KS, da Silva L, Chen YT, Shin SJ, et al. CT-X antigen expression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13493-8.
123. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2002;188:22-32.
124. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 2009;100(11):2014-21.
125. Chen YT, Ross DS, Chiu R, Zhou XK, Chen YY, Lee P, et al. Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. *PLoS One*. 2011;6(3):e17876.
126. Curigliano G, Viale G, Ghioni M, Jungbluth AA, Bagnardi V, Spagnoli GC, et al. Cancer-testis antigen expression in triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(1):98-103.

127. Coombes RC, Caballero OL, Shousha S, Ghaem-Maghami S, Woodley-Barker L, Wilhelm-Benartzi CS, et al. NY-ESO-1 expression in DCIS: A new predictor of good prognosis. *Oncoscience*. 2017;4(3-4):33-40.
128. Lee HJ, Kim JY, Song IH, Park IA, Yu JH, Gong G. Expression of NY-ESO-1 in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a Good Prognosis. *Oncology*. 2015;89(6):337-44.
129. Bender A, Karbach J, Neumann A, Jager D, Al-Batran SE, Atmaca A, et al. LUD 00-009: phase 1 study of intensive course immunization with NY-ESO-1 peptides in HLA-A2 positive patients with NY-ESO-1-expressing cancer. *Cancer Immun*. 2007;7:16.
130. Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y, Ritter E, Ferrara CA, Ritter G, et al. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1650-5.
131. Jager E, Karbach J, Gnjjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, et al. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(39):14453-8.
132. Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal*. 1991;5(5):344-66.
133. Zhou J, Fan X, Chen N, Zhou F, Dong J, Nie Y, et al. Identification of CEACAM5 as a Biomarker for Prewarning and Prognosis in Gastric Cancer. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(12):922-30.
134. Soeth E, Wirth T, List HJ, Kumbhani S, Petersen A, Neumaier M, et al. Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2001;7(7):2022-30.
135. Blumenthal RD, Leon E, Hansen HJ, Goldenberg DM. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer*. 2007;7:2.
136. Stein R, Goldenberg DM. A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(12):1559-64.
137. Azim HA, Jr., Singhal S, Ignatiadis M, Desmedt C, Fumagalli D, Veys I, et al. Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis. *PLoS One*. 2013;8(4):e62451.
138. Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, Itoh K. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7247-52.
139. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):15-33.