FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA

RENAN GOMES DO NASCIMENTO

**Avaliação do perfil de expressão imuno-histoquímica dos membros da
família PHLDA (*Pleckstrin homology like domain family A*) e potencial valor
prognóstico em câncer de mama**

São Paulo

2020

RENAN GOMES DO NASCIMENTO

Avaliação do perfil de expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA (*Pleckstrin homology like domain family A*) e potencial valor prognóstico em câncer de mama

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

Programa de Pós-graduação em Oncologia

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida Nagai

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Renan Gomes do
Avaliação do perfil de expressão imuno-
histoquímica dos membros da família PHLDA (Pleckstrin
homology like domain family A) e potencial valor
prognóstico em câncer de mama / Renan Gomes do
Nascimento. -- São Paulo, 2020.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Domínio homólogo a plequistrina
família A 2.Neoplasia da mama 3.Resposta endócrina
4.Proteína quinase B 5.Biomarcadores 6.Imuno-
histoquímica

USP/FM/DBD-104/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, pois sem Ele nada disso seria possível, confortou-me e foi meu combustível nas inúmeras dificuldades enfrentadas ao longo desta jornada.

Aos meus pais **Idineis** e **Osvaldo**, que são responsáveis pela formação de meu caráter, dignidade, respeito e amor ao próximo. Obrigado por acreditarem em meu sonho!

Á minha namorada, amiga, companheira de todos os momentos e futura esposa, **Aryane**. Quero agradecer por todo apoio moral, conselhos, carinhos, ajuda e conforto. Pessoa no qual partilha planos e sonhos para nosso futuro próximo.

Aos meus avós **Lurdes** e **Aristirdes**, que sempre foram um exemplo de humildade, honestidade e humanismo. Nunca esquecerei de todo apoio e carinho, obrigado por todas orações!

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos e gratidão à Prof(a). Dr(a). **Maria Aparecida Nagai** pelas orientações e inúmeros ensinamentos compartilhados.

Aos monitores de pesquisa **Flávia** e **Carolina**, pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos dentro de nosso grupo.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular, **Mércia**, **Daniel**, **Ana Paula** e **Andrés**. Obrigado por todo apoio, conhecimentos compartilhados, algumas saideiras, inúmeros “*scientific cafezinho*” e pelos momentos de muitas risadas e descontração.

Aos amigos que passaram ao longo dos anos em nosso laboratório de pesquisa e que tive a oportunidade de conhecer, **Simone**, **Lourival**, **Naiele**, **Maria**, **Maira** e **Mônica**. Obrigado pelo companheirismo, amizade e apoio profissional.

Obrigado **Daniel**, por que finalmente foi possível conversar sobre moda de viola e sertanejo raiz com alguém nesse laboratório.

Obrigado **Mércia**, pelas conversas sobre futebol e por jogar o Cartola FC, mesmo sabendo que eu seria campeão (kkk).

Ao **Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)** no 8º andar do **Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)**, por toda infraestrutura para realização deste projeto.

A todos **Alunos de Pós-graduação, Professores, Pesquisadores e Funcionários** do **CTO** e da **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)**. Seria uma atividade muito difícil e trabalhosa de citar o nome de cada um e poderia acabar sendo injusto em esquecer o nome de alguém, portanto, faço aqui meu reconhecimento e desejo-lhes boa sorte a todos os grupos de profissionais comprometidos com a ciência e que vem buscando trazer benefícios para a saúde pública.

Obrigado a todos meus **Familiares**, que sempre me apoiaram e me incentivaram ao longo desta jornada científica.

Agradeço a todos meus **Amigos**, sejam de Tempos de Faculdade, de Longa Data, de Futebol, Companheiros de Profissão, do Conselho Regional de Farmácia (CRF), da Sociedade Brasileira de Farmacêuticos em Oncologia (SOBRAFO), entre outros. Muito obrigado por cada momento!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo aporte financeiro concedido ao longo deste projeto de pesquisa.

“Feliz é o homem que persevera na provação, porque depois de aprovado receberá a coroa da vida, que Deus prometeu aos que o amam”.

Tiago 1:12

“Não se mede o valor de um homem pelas suas roupas ou pelos bens que possui, o verdadeiro valor do homem é o seu caráter, suas ideias e a nobreza dos seus ideais”.

Charles Chaplin

“Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”.

John Quincy Adams

RESUMO

Nascimento RG. Avaliação do perfil de expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA (*Pleckstrin homology like domain family A*) e potencial valor prognóstico em câncer de mama [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Apesar dos avanços na classificação molecular do câncer de mama, nossa compreensão da fisiopatologia da doença ainda é limitada, principalmente devido à considerável heterogeneidade intratumoral. Assim, centenas de outros candidatos a biomarcadores vêm sendo investigados e estudados para possíveis implicações no diagnóstico, prognóstico e terapia personalizada. Nesse contexto, os membros da família PHLDA (*Pleckstrin homology like domain family A*), composta por três genes localizados em diferentes cromossomos: PHLDA1 (12q21.2), PHLDA2 (11p15.4) e PHLDA3 (1q32.1) estão sob investigação por diferentes grupos de pesquisa como potenciais biomarcadores em vários tipos de câncer. Foi relatado que a expressão alterada desses genes está envolvida no processo tumorigênico. No entanto, o valor prognóstico e preditivo das proteínas de PHLDA1, 2 e 3 no câncer de mama ainda não foi definido. Portanto, neste estudo, procuramos determinar o padrão de expressão proteica dos membros da família PHLDA por imuno-histoquímica (IHQ) em uma grande coorte de amostras de pacientes com câncer de mama luminal e estimar o valor prognóstico potencial desses candidatos a biomarcadores. Este estudo foi baseado em uma coorte de conveniência composta de 493 amostras de tumores primários de mama do subtipo luminal, divididos em cinco blocos de TMA (*Tissue Microarray*) para a avaliação IHQ da expressão proteica dos integrantes da família PHLDA. Todas as análises quantitativas de PHLDA1, PHLDA2 e PHLDA3 foram avaliadas e pontuadas em células tumorais pelo *software* de patologia digital QuPath. No final, as amostras foram categorizadas em dois grupos (negativo e positivo ou *low* e *high*), com base nos valores calculados de células tumorais positivas para cada marcador do estudo, e esses dados foram correlacionados com características demográficas, clínico-patológicas e de sobrevida das pacientes. A avaliação IHQ revelou que a expressão de PHLDA1 e PHLDA2 foi identificada predominantemente no citoplasma de células tumorais da mama, enquanto isso, PHLDA3 apresentou prevalente imunorreatividade nuclear e perinuclear, e menos frequentemente citoplasmática. Na população avaliada não foram observadas diferenças significativas entre a expressão dos membros da família PHLDA e a sobrevida das pacientes. Entretanto, nossa avaliação IHQ apoiada por análises de banco de dados, mostrou que a expressão diferencial dos integrantes da família PHLDA podem estar associados com a resposta ao tratamento anti-hormonal. Embora preliminares, nossos achados sugerem que a expressão de PHLDA2 e PHLDA3 pode ter um valor preditivo de resposta à terapia endócrina em pacientes com câncer de mama do subtipo luminal. Os resultados deste trabalho fornecem informações importantes sobre o papel dos membros da família PHLDA na tumorigênese da mama e o impacto na sobrevida e na resposta à terapia endócrina das pacientes com câncer de mama. Descritores: PHLDAs; neoplasia da mama; resposta endócrina; AKT; biomarcadores; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Nascimento RG. Evaluation of the immunohistochemical expression profile of PHLDA (*Pleckstrin homology like domain family A*) and potential prognostic value in breast cancer [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Despite advances in the molecular classification of breast cancer, our understanding of the pathophysiology of the disease is still limited, mainly due to the considerable intratumoral heterogeneity. Thus, hundreds of other candidates for biomarkers have been investigated and studied for possible implications for diagnosis, prognosis and personalized therapy. In this context, the members of the PHLDA family (*Pleckstrin homology like domain family A*), composed of three genes located on different chromosomes: PHLDA1 (12q21.2), PHLDA2 (11p15.4) and PHLDA3 (1q32.1) are under investigation by different research groups as potential biomarkers in various types of cancer. It has been reported that the altered expression of these genes is involved in the tumorigenic process. However, the prognostic value of mRNA and PHLDA1, 2 and 3 proteins in breast cancer has not yet been defined. Therefore, in this study, we sought to determine the pattern of protein expression of the PHLDA family members by immunohistochemistry (IHC) in a large cohort of samples from patients with luminal breast cancer and to estimate the potential prognostic value of these candidates for biomarkers. This study was based on a convenience cohort composed of 493 samples of primary breast tumors of the luminal subtype, divided into five blocks of TMA (Tissue Microarray) for the IHC assessment of the protein expression of the members of the PHLDA family. All quantitative analyzes of PHLDA1, PHLDA2 and PHLDA3 were evaluated and scored on tumor cells by the digital pathology software QuPath. In the end, the samples were categorized into two groups (negative and positive or low and high), based on the calculated values of positive tumor cells for each marker in the study, and these data were correlated with demographic, clinical-pathological and patient survival characteristics. The IHQ evaluation revealed that the expression of PHLDA1 and PHLDA2 was identified predominantly in the cytoplasm of breast tumor cells, meanwhile, PHLDA3 showed prevalent nuclear and perinuclear immunoreactivity, and less frequently cytoplasmic. Here, no significant differences were observed between the expression of the PHLDA family members and the patients' survival. However, our IHC assessment, supported by database analyzes showed that the differential expression of the members of the PHLDA family might be associated with the response to anti-hormonal treatment. Although preliminary, our findings suggest that the expression of PHLDA2 and PHLDA3 may have a predictive value for response to endocrine therapy in patients with luminal subtype breast cancer. The results of this work provide valuable information about the role of members of the PHLDA family in breast tumorigenesis and the impact on survival and response to endocrine therapy in patients with breast cancer. Descriptors: PHLDA; breast cancer; endocrine response; AKT; biomarkers; immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer em escala global	17
Figura 2. Incidência dos principais tipos de câncer no Brasil em mulheres	18
Figura 3. Modelo de evolução clonal no câncer de mama	23
Figura 4. Representação esquemática da estrutura modular das proteínas dos três membros da família PHLDA	30
Figura 5. Delineamento experimental	44
Figura 6. Esquema representativo da construção dos <i>Tissue microarrays</i> (TMAs)	47
Figura 7. Coloração imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA em amostras de câncer de mama	52
Figura 8. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) de pacientes com câncer de mama luminal estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA1	59
Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) de pacientes com câncer de mama luminal estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA2	60
Figura 10. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) de pacientes com câncer de mama luminal estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA3	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama	28
Tabela 2. Características demográficas e clínico-patológicas das 493 pacientes com câncer de mama do subtipo luminal incluídas no estudo	45
Tabela 3. Anticorpos utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica e respectivas diluições	48
Tabela 4. Associação da expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA de acordo com fatores clínico-patológicos e marcadores biomoleculares em tumores luminais de mama	54
Tabela 5: Associação da expressão gênica dos membros da família PHLDA de acordo com fatores clínico-patológicos e marcadores biomoleculares em tumores luminais de mama (GSE9893)	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	(<i>Serine/threonine kinase 1</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
AURKA	Aurora quinase A (<i>Aurora kinase A</i>)
BL	(<i>Basal-like</i>)
BRCA1	Câncer de mama 1 (<i>Breast cancer 1</i>)
BRCA2	Câncer de mama 2 (<i>Breast cancer 2</i>)
CDI	Carcinoma ductal invasivo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CL	(<i>Claudin-low</i>)
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CPTAC	(<i>Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium</i>)
DD-PCR	<i>Differential display</i> PCR
DFS	Sobrevida livre de doença (<i>Disease-free survival</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	17 β -estradiol
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EGFR receptor)	Receptor do fator de crescimento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Transição epitélio mesênquima (<i>Epithelial mesenchymal transition</i>)
ER	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen receptor</i>)
ERK	(<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>)
EZH2	(<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>)
Fas	(<i>First apoptotic signal</i>)
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
FGFR receptors)	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos (<i>Fibroblast growth factor</i>
GEO	(<i>Gene Expression Omnibus</i>)
HER2 receptor 2)	Receptor de fator de crescimento epidermal 2 (<i>Human epidermal growth factor</i>

H&E	(<i>Hematoxilina-eosina</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ID	Identificação (<i>Identity</i>)
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (<i>Insulin-like growth factors 1</i>)
IHQ	Imuno-histoquímica
IM	Imunomodulador (<i>Immunomodulatory</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ipl	(<i>Imprinted in placenta and liver</i>)
Kb	(<i>Kilobase pairs</i>)
kDa	(<i>Kilodalton</i>)
LAR	Receptor de andrógeno luminal (<i>Luminal androgen receptor</i>)
M	Mesenquimal (<i>Mesenchymal</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
miRNA	Micro ácido ribonucleico
MSL	(<i>Mesenchymal stem-like</i>)
mTOR	(<i>Mammalian target of rapamycin</i>)
ND	Não determinado
NF-κB	(<i>Nuclear factor kappa B</i>)
NTE	Nenhum tipo específico
OS	Sobrevida global (<i>Overall survival</i>)
p	Braço curto do cromossomo
PARP	(<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>)
PAS	(<i>Periodic acid-reactive schiff</i>)
Pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PDX	Xenoinxerto derivado do paciente (<i>Patient-derived xenograft</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	Prolina-histidina

PHL	Domínio homólogo a plequistrina (<i>pleckstrin homology-like</i>)
PHLDA	Família A de domínio homólogo a plequistrina (<i>Pleckstrin homology-like domain family A</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase (<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>)
PIPs	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PKC	Proteinase quinase C (<i>Protein kinase C</i>)
PQ	Prolina-glutamina
PR	Receptor de Progesterona (<i>Progesterone receptor</i>)
PTEN	Homólogo à fosfatase e tensina (<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>)
q	Braço longo do cromossomo
QQ	Poli-glutamina
QuPath	(<i>Quantitative Pathology</i>)
RanBP9	(<i>Ran-binding protein 9</i>)
Ras	(<i>Rat sarcoma</i>)
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RTK	Receptor tirosina quinase (<i>Receptor tyrosine kinase</i>)
SBR	(<i>Scarff-Bloom-Richardson</i>)
shRNA	(<i>Short hairpin RNA</i>)
siRNA	(<i>Small interfering RNA</i>)
TCGA	(<i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TDAG51	(<i>T – cell death – associated gene 51</i>)
Tih1	(<i>TDAG/Ipl homolog-1</i>)
TMA	Micro arranjo de tecido (<i>Tissue microarray</i>)
TN	Triplo Negativo
TP53	Proteína tumoral p53 (<i>Tumor protein p53</i>)
TSSC3	(<i>Tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment candidate gene 3</i>)
µm	Micrômetro
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia e Etiologia do Câncer de Mama	16
1.2 Fatores de Risco do Câncer de Mama	18
1.3 Classificação Histológica e Molecular do Câncer de Mama	22
1.4 Membros da Família PHLDA (<i>Pleckstrin homology-like domain family A</i>)	29
1.5 PHLDA1: Papel Biológico e Relação com o Câncer de Mama	31
1.6 PHLDA2: Papel Biológico e Relação com o Câncer de Mama	36
1.7 PHLDA3: Papel Biológico e Relação com o Câncer de Mama	39
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Pacientes e Espécimes Tumoriais	43
3.2 Construção dos <i>Tissue Microarrays</i> (TMAs)	46
3.3 Coloração Imuno-histoquímica (IHQ)	47
3.4 Avaliação de Imunomarcagem	48
3.5 Análise Estatística	49
4. RESULTADOS	51
4.1 Expressão dos Membros da Família PHLDA em Tumores Primários de Mama	51
4.2 Associação da Expressão Proteica dos Membros da Família PHLDA com Características Clínico-patológicas	53
4.3 Associação da Expressão Gênica dos Membros da Família PHLDA com Características Clínico-patológicas Acessados da Plataforma GEO	56
4.4 Impacto da Expressão Proteica dos Membros da Família PHLDA na Sobrevida das Pacientes com Câncer de Mama	58
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Etiologia do Câncer de Mama

O câncer nas últimas décadas tem se tornado uma das principais causas de morbimortalidade em nível de escala global, como resultado em grande parte, pelas transições demográficas, econômicas e epidemiológicas (BAN; GODELLAS, 2014; HARBECK; GNANT, 2017; LUKONG, 2017). Apesar dos inúmeros esforços da *World Health Organization* (WHO) e da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) na implementação de guias técnicos para o desenvolvimento e implementações de atividades na prevenção e controle do câncer dentro de uma abordagem de políticas públicas, estimam-se cerca de 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer em todo o mundo anualmente (FERLAY et al., 2019; PRAGER et al., 2018). No atual cenário, já é observado que devido ao crescente aumento global de novos casos de câncer, que acabam exercendo uma pressão significativa nos sistemas de saúde em países de todos os níveis socioeconômicos, o câncer está superando as doenças cardiovasculares como um dos principais causadores de mortes, principalmente em países de baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) (CAO et al., 2017; PRAGER et al., 2018). Além disso, o impacto econômico do câncer em 2010 foi estimado em torno de US\$ 1,16 trilhão (STEWART; WILD, 2014).

Entre a população feminina, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente do mundo (154 de 185 países), exceto na África Ocidental, em que o câncer de colo de útero prevaleceu. Em 2018, estima-se que 2,1 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, aproximadamente um novo caso diagnosticado a cada 18 segundos. Além disso, o câncer de mama também representa as maiores taxas de mortalidade por câncer em mulheres pelo globo (103 de 185 países), com uma estimativa de aproximadamente 626.600 mortes pela doença, sendo as principais exceções os países do Norte da Europa, América do Norte e África Subsaariana, onde as principais causas de óbitos foram por conta do câncer de colo de útero e/ou de pulmão (Figura 1) (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019; TORRE et al., 2017). Apesar das reduções dos números de mortes por câncer de mama em países de alto IDH, desde a década de 90, outros países historicamente de baixa e média renda, tem sofrido aumento nas taxas de mortalidade, muito em função das barreiras do acesso ao diagnóstico e tratamento e do ônus econômico (BELLANGER et al., 2018). Embora descrito há mais de 3.500 anos atrás pelos egípcios, o câncer de mama continua sendo um importante dilema de saúde pública, especialmente devido a urbanização, ao desenvolvimento econômico, as mudanças nos padrões

culturais e de estilo de vida, as campanhas ineficientes de prevenção e conscientização, aos déficits significativos de recursos humanos treinados, além das lacunas no acesso ao tratamento anticâncer de alta qualidade (AKRAM et al., 2017; HARBECK et al., 2019; LUKONG, 2017).

Figura 1: Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer em escala global. Frequência de novos casos e mortes por câncer em todo o mundo previsto para o ano de 2018 do gênero feminino (BRAY et al., 2018).

No Brasil, de acordo com a última publicação para o biênio 2020-2021, produzidas pela Divisão de Vigilância e Análise de Situação da Coordenação de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-se 66.280 casos novos de câncer de mama anualmente, com um risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 2). Sem considerar o câncer de pele não melanoma, esse tipo de neoplasia maligna é a segunda mais incidente na população geral e a mais incidente entre a população feminina do Brasil, representando aproximadamente 29,7% de todos os casos de câncer nesta população, superando a média mundial que foi estimada em torno de 24,2%. Além disso, o câncer de mama se apresenta como a forma de câncer mais letal em mulheres brasileiras, com uma estimativa de aproximadamente 16.724 óbitos/ano, representando uma proporção de 16,1% das causas de mortes decorrentes de câncer (SCHILITZ et al., 2019).

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Figura 2. Incidência dos principais tipos de câncer no Brasil em mulheres. Número de novos casos de câncer em mulheres previsto para o ano de 2018. Adaptado do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2018.

1.2 Fatores de Risco do Câncer de Mama

O câncer de mama, não diferentemente de tantos outros tipos tumorais, carrega em sua história uma etiologia complexa e multifatorial, além disso, exibem impressionante heterogeneidade intertumoral ilustrada pelos níveis epidemiológicos e de estadiamento clínico, e, heterogeneidade intratumoral, ocorrendo nos níveis morfológicos, genômicos, transcriptômicos e proteômicos, que acabam conferindo curso clínico variado e importantes desafios no diagnóstico, prognóstico e na terapia de diferentes indivíduos (AKRAM et al., 2017; SKIBINSKI; KUPERWASSER, 2015; TURASHVILI; BROGI, 2017). Basicamente os fatores de risco para o câncer de mama são divididos em fatores inerentes conhecidos como não modificáveis, tais como idade, sexo, etnia, exposição aos hormônios esteroides endógenos, lesões proliferativas benignas na glândula mamária e predisposição genética, e, fatores extrínsecos chamados de modificáveis ou potencialmente modificáveis, que são condicionados ao estilo de vida (sedentarismo, etilismo, tabagismo e número de gestações), dieta e intervenções farmacológicas a longo prazo, como uso de contraceptivos hormonais orais ou terapia de reposição hormonal (KAMIŃSKA et al., 2015; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013). A identificação de fatores de risco modificáveis ou potencialmente modificáveis pode contribuir em estratégias atraentes na prevenção ao nível primário de atenção

à saúde, conduzida por pesquisas e profissionais multidisciplinares para redução da incidência do câncer de mama (GUERRERO et al., 2017; KOLAK et al., 2017).

O histórico familiar é um fator de risco importante e bem estabelecido em relação às predisposições genéticas no desenvolvimento do câncer de mama, representando até 10% de todos os casos recém-diagnosticados (HOWELL et al., 2014; KAMIŃSKA et al., 2015). Estes indivíduos com suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama herdam mutações com padrão autossômico dominante em genes supressores tumorais ou proto-oncogenes, conferindo risco aumentado da ocorrência de câncer de mama em idade precoce, câncer bilateral da mama e câncer de mama masculino (KLEIBL; KRISTENSEN, 2016; MELVIN et al., 2016). As mais frequentes mutações germinativas ocorrem nos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2 que possuem papel crítico na manutenção da instabilidade genômica pelo seu papel na sinalização de danos e reparo no DNA, e regulação da proliferação celular, entretanto, devido à grande estrutura de ambos os genes, além da complexidade de suas inúmeras funções, a penetrância desses genes dependerá do tipo de mutação, variantes genéticas e fatores exógenos, e, portanto, não é um indicador direto de doença (KOTSOPoulos, 2018; ROY; CHUN; POWELL, 2012). Em uma análise prospectiva recente com aproximadamente 4 mil mulheres portadoras de mutações deletérias da linhagem germinativa BRCA1 e BRCA2, foi relatado um risco cumulativo médio de câncer de mama aos 80 anos de idade de 72% e 69%, respectivamente (KUCHENBAECKER et al., 2017). Outros genes já foram identificados associados com um risco aumentado para o câncer de mama familiar, estes incluem genes de alta penetrância, tais como TP53, PTEN, CDH1, STK11, RAD51C e RAD51D (LARSEN et al., 2014; SHIOVITZ; KORDE, 2015). O restante dos casos se distribui entre os genes de moderada ou baixa penetrância, tais como CHEK2, BRIP1, ATM, e PALB2 (LARSEN et al., 2014; SHIOVITZ; KORDE, 2015). No Brasil, a síndrome de Li-Fraumeni que é um distúrbio genético autossômico dominante, herdado pela mutação em TP53 com substituição de uma arginina por uma histidina no códon 337 (R337H) predispondo portadores a uma ampla variedade de tumores de início precoce, dentre eles o câncer de mama, vem despertando a atenção de muitos geneticistas e oncologistas, devido à alta prevalência principalmente nas regiões sul e sudeste, estando presente em 0,3% destas populações locais (ANDRADE et al., 2016, 2017).

Entretanto, a grande maioria dos tumores de mama ocorre de forma esporádica, resultantes de mutações e instabilidade genômica, fenômenos epigenéticos, aquisição de mecanismos de resistência à morte celular programada, proliferação celular exacerbada e

alterações nos processos de diferenciação e motilidade em células somáticas constituintes do tecido mamário (FENG et al., 2018b; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer de mama é principalmente, embora não exclusivamente, uma doença de mulheres (HOWELL et al., 2014). Os casos de câncer de mama masculino são raros, constituindo menos de 1% de todos os eventos recém-diagnosticados. Apesar desta ocorrência esporádica, algumas análises de dados epidemiológicos têm apontado um aumento na frequência de casos nas ultimas 3 décadas (OTTINI et al., 2010; SPEIRS; SHAABAN, 2009). A incidência da neoplasia maligna mamária é frequentemente observada em mulheres na menopausa. Em contrapartida, mulheres jovens (<40 anos) são menos acometidas (ANGAHAR, 2017; BAN; GODELLAS, 2014). Em 2016, aproximadamente 71% de todos os casos de mortes associadas ao câncer de mama nos Estados Unidos, foram relatadas em mulheres acima de 40 anos de idade, demonstrando que o envelhecimento inevitavelmente aumenta o risco para esta doença (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Em geral, mulheres caucasianas são mais propensas ao desenvolvimento do câncer de mama do que mulheres afrodescendentes, além disso, mulheres asiáticas e hispânicas não brancas apresentam um risco ainda menor de desenvolverem esta neoplasia (BAN; GODELLAS, 2014; SUN et al., 2017).

O maior tempo de exposição da glândula mamária aos hormônios esteroídicos endógenos, devido a uma menarca precoce e menopausa tardia, terá influência direta no risco de ocorrência do câncer de mama (ANGAHAR, 2017). Mulheres nas quais a menarca ocorreu antes dos 12 anos de idade, o risco cumulativo é de 6% para o câncer de mama a cada ano que antecedeu a idade da puberdade (DAY et al., 2017). Da mesma forma, para cada ano de ciclos menstruais completos, especialmente após os 55 anos de idade, o risco para a neoplasia mamária sobe em 6% (DAY et al., 2015). Enquanto que, mulheres que realizam o procedimento de ooforectomia bilateral profilática (menopausa induzida) aos 40 anos de idade, apresentam risco reduzido em até 50% para o câncer de mama, comparado com as mulheres que entram em menopausa natural (ANJUM et al., 2017; BAN; GODELLAS, 2014).

Os fatores reprodutivos tais como idade da primeira gestação, amamentação, nuliparidade e uso de contraceptivos hormonais orais, podem promover impacto no risco de ocorrência para o câncer de mama (HOWELL et al., 2014; KOLAK et al., 2017). Mulheres com a primeira gravidez a termo antes dos 20 anos de idade apresentam um risco reduzido de até 40% para o desenvolvimento de câncer de mama, quando comparado com as mulheres que tiveram uma gravidez após os 35 anos de idade (KAMIŃSKA et al., 2015; RUSSO; RUSSO, 2011). As explicações propostas incluem sensibilidade alterada da glândula mamária a exposições hormonais posteriores; redução no número de células-tronco e, conseqüentemente, eliminação

de alvos para transformação maligna; e alterações nos padrões de expressão gênica, resultando em proliferação reduzida e aumento na diferenciação das células da glândula mamária (HARBECK et al., 2019). Entre as mulheres nulíparas, estudos epidemiológicos apontam um risco quatro vezes maior da ocorrência do câncer de mama na menopausa em comparação as mulheres que tiveram uma gravidez a termo em idade jovem (RUSSO; RUSSO, 2011). A lactação prolongada confere um efeito protetor contra o desenvolvimento da neoplasia, sendo que, para cada ano de amamentação a uma redução de risco em aproximadamente 4% (BERAL et al., 2002). A relação entre o uso de contraceptivos hormonais orais (estrógeno e progesterona) e o risco para o câncer de mama ainda permanece a ser totalmente elucidado. No geral, alguns estudos epidemiológicos têm apontado que mulheres que fazem o uso destes contraceptivos orais contendo hormônios exógenos, pode elevar em aproximadamente 20% o risco de desenvolverem o câncer de mama em comparação as mulheres não adeptas deste método contraceptivo (BAN; GODELLAS, 2014; HUNTER et al., 2010; MØRCH et al., 2017).

O sobrepeso e a obesidade principalmente em mulheres na pós-menopausa tem sido considerado um fator de risco importante para o câncer de mama, levando em consideração que os ovários após a menopausa param de produzir estrógeno, sendo a maior parte produto da atividade do tecido adiposo, desta forma, aumentando os níveis séricos deste hormônio esteroide e paralelamente aumentando o risco para esta neoplasia (BUDNY et al., 2019; FENG et al., 2018b). Além disso, o sobrepeso e a obesidade já foram correlacionados a um pior prognóstico no câncer de mama, com maior risco de recorrência, resistência terapêutica e aumento na formação de metástase (BOUSQUENAUD et al., 2018). Em contrapartida, atividade física regular com uma frequência de 3 a 5 vezes por semana, especialmente as mulheres na menopausa, tem mostrado redução do risco de ocorrência de câncer de mama em torno de 25%, muito em função da melhora da aptidão geral, controle de peso, fortalecimento do sistema imunológico e balanço energético (AKRAM et al., 2017; WOLIN; TUCHMAN, 2011). O consumo de produtos ricos em gordura, principalmente carne vermelha e alimentos lácteos, bem como, produtos ultra processados, podem ser um fator desencadeante de transformação neoplásica de células da glândula mamária (ANGAHAR, 2017; ANJUM et al., 2017). De outro modo, a ingestão de alimentos com grande quantidade de antioxidantes ou ricos em vitamina D pode levar em redução no risco relativo da doença (BAUER et al., 2013; KAMIŃSKA et al., 2015).

Uma grande parte dos estudos epidemiológicos tem demonstrado que o consumo de álcool regularmente pode oferecer um risco ligeiramente maior para o câncer de mama, e este aumento de risco está diretamente relacionado com a quantidade e frequência do consumo

(BAGNARDI et al., 2013; SUN et al., 2017). Já o tabagismo muitos estudos epidemiológicos afirmam haver pouca ou nenhuma relação com o aumento do risco para a neoplasia mamária (HOWELL et al., 2014; KAWAI et al., 2014). A terapia de reposição hormonal tem sido utilizada para aliviar os sintomas da menopausa e na prevenção da osteoporose, contudo, pode aumentar o risco de câncer de mama, e este aumento de ocorrência irá depender diretamente dos constituintes hormonais, principalmente usuárias de estrógeno e progesterona, da duração e do tempo de cessamento do tratamento (BAN; GODELLAS, 2014; NAROD, 2011).

Certas lesões não proliferativas na glândula mamária podem impactar em um pequeno risco para o câncer de mama, estas lesões incluem, por exemplo, fibrose, adenose e metaplasia escamosa. Contudo, lesões proliferativas de caráter benigno nos ductos ou lóbulos mamários (hiperplasia com atipia) o risco de câncer de mama pode aumentar de 4 a 5 vezes (HARTMANN et al., 2005; MEISNER; HOUMAN FEKRAZAD; ROYCE, 2008; SUN et al., 2017). A exposição significativa às radiações ionizantes é uma causa bem estabelecida não apenas para o câncer de mama, como também para tantos outros tipos tumorais. As mulheres jovens apresentam um maior risco em comparação com as mulheres expostas após os 40 anos de idade, possivelmente devido à diferenciação incompleta do tecido mamário. O risco aumenta de forma linear de acordo com a dose e o tempo de exposição (BAN; GODELLAS, 2014; HOWELL et al., 2014).

1.3 Classificação Histológica e Molecular do Câncer de Mama

Em função de observações epidemiológicas e morfológicas, atualmente tem sido propostos modelos lineares envolvendo os processos de iniciação, transformação e progressão no câncer de mama (RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). De acordo com o modelo de expansão e seleção clonal, o câncer de mama ocorre devido ao acúmulo de alterações moleculares em células individuais decorrentes de um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas e interações aberrantes com o microambiente estromal, conferindo novos fenótipos e comportamentos celulares (HARBECK et al., 2019). Durante este processo de múltiplos estágios o controle dos processos de proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular tornam-se desregulados (BOMBONATI; SGROI, 2011; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

Apesar da grande heterogeneidade dos tumores de mama, modelos morfológicos representativos têm sido propostos para elucidar a iniciação e o desenvolvimento desta doença. Inicialmente é suposto que ocorram lesões pré-malignas (hiperplasia intraductal com atipia) nas

quais irão ser formadas camadas anormais de células no interior do ducto ou lóbulo mamário. Progredimento possivelmente para o carcinoma *in situ*, onde ocorrem as manifestações primárias de anormalidades genéticas e epigenéticas nas células epiteliais, além disso, as células mioepiteliais apresentam-se genotipicamente e fenotipicamente alteradas e em número reduzido, ocorrendo ainda um aumento no número de fibroblastos, linfócitos e células endoteliais no estroma circundante. Estas alterações podem evoluir para o carcinoma invasivo, caracterizado pelo extravasamento total da membrana basal e subsequentemente invasão das células tumorais proliferativas no estroma mamário, levando o recrutando de diversas células deste microambiente e proteínas da ECM (*extracellular matrix*). Finalmente no estágio metastático, as células tumorais proliferativas podem invadir o sistema linfovascular e sobreviver na ausência de adesão celular (*anoikis*), abandonar a vasculatura que ali estavam e estabelecer manifestações metastáticas em sítios secundários, tais como, ossos, fígado, pulmão e cérebro (Figura 3) (HARBECK et al., 2019; MAKKI, 2015; POLYAK, 2007; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

Figura 3: Modelo de evolução clonal no câncer de mama. Esquema representativo da estrutura normal da glândula mamária, progredindo para o carcinoma ductal *in situ*, invasivo e metastático. Células normais do ducto mamário são compostas de membrana basal e células epiteliais e mioepiteliais. As células que compõem o estroma incluem os leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. No carcinoma *in situ*, as células mioepiteliais são geneticamente e fenotipicamente alteradas e em número reduzido devido a degradação da membrana basal. Ocorre um aumento do número de diferentes componentes celulares no estroma. Estas alterações promovem a progressão para o carcinoma invasivo, nas quais as células tumorais acabam invadindo os tecidos circundantes, migrando para órgãos distantes, conduzindo efetivamente para a metástase (POLYAK, 2007).

Para o estudo morfológico do câncer de mama, devemos compreender se o tumor está limitado ao componente epitelial da mama ou invadiu o estroma circundante e se o tumor surgiu nos ductos ou lóbulos mamários (VUONG et al., 2014). Contudo, na prática histopatológica, as características de tipo celular, quantidade de células, tipo e localização de secreção, perfil imuno-histoquímico e características arquitetônicas iram determinar o tumor como ductal ou lobular, além de, suas subclassificações, em vez de sua localização precisa no tecido mamário (MAKKI, 2015; NOUNOU et al., 2015). Cerca de 50 a 80% dos casos recém-diagnosticados de câncer de mama são chamados de carcinoma ductal invasivo (CDI), o restante dos casos são classificados como carcinomas lobulares invasivos (CLI) (HENRY; CANNON-ALBRIGHT, 2019). Os CDIs podem ser classificados como “nenhum tipo específico” pelo fato destes tumores não exibirem características morfológicas suficientes para serem determinados como um tipo histológico característico ou podem ser reconhecidos como “tipo especial” por características distintivas suficientes e comportamento celular e molecular particular (HENRY; CANNON-ALBRIGHT, 2019; MASOOD, 2016). Os tipos especiais de câncer de mama mais frequentes incluem: carcinoma medular, carcinoma metaplásico, carcinoma apócrino, carcinoma mucinoso, carcinoma cribriforme, carcinoma tubular, carcinoma neuroendócrino, carcinoma lobular clássico e carcinoma lobular pleomórfico (MASOOD, 2016).

No entanto, sabemos que o câncer de mama representa uma coleção de doenças biologicamente e fenotipicamente heterogênea e com diferentes comportamentos clínicos e de resposta ao tratamento (FENG et al., 2018b). Nesta era da medicina moderna, somente a caracterização do câncer de mama a nível celular e quanto à estrutura arquitetônica, tornou-se insuficiente para prever o real comportamento dessa neoplasia (FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018; MASOOD, 2016). Desta forma, muitos estudos têm sido voltados em análises nos padrões moleculares do câncer de mama, a fim de agrupar esses tumores em classes ou entidades para servir de auxílio no manejo clínico, na elaboração de estudos epidemiológicos e funcionais e na condução de ensaios clínicos (BURSTEIN et al., 2015; LEHMANN et al., 2011, 2016; PEROU et al., 2000; PRAT; PEROU, 2011; SORLIE et al., 2001, 2003).

O trabalho pioneiro de Perou, Sorlie e colaboradores no início deste milênio, classificou o câncer de mama molecularmente em subgrupos distintos, com base em similaridades nos perfis de expressão gênica, usando a técnica de cDNA *microarray*. Desta forma, estes trabalhos demonstraram que existem subtipos de câncer de mama com diferenças nos padrões de expressão gênica, refletindo o fenótipo individual, o prognóstico da doença e o planejamento sistêmico de tratamento (TSANG; TSE, 2020). Com base nos estudos abrangentes de perfil de expressão gênica, foram revelados quatro subtipos moleculares clinicamente relevantes:

Luminal A, Luminal B, HER2 Enriquecido (HER2+) e Triplo Negativo (TN) (HARBECK et al., 2019). Os grupos de genes responsáveis principalmente pela segregação dos subtipos moleculares do câncer de mama, são genes relacionados a expressão dos receptores hormonais de estrógeno (ER-*estrogen receptor*) e progesterona (PR-*progesterone receptor*), HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) e regulador de proliferação celular (Ki-67) (LUKONG, 2017). O painel imuno-histoquímico com esses quatro biomarcadores (ER/PR/HER2/Ki-67) tem sido considerado eficiente e significativo na estratificação destas entidades moleculares (TSANG; TSE, 2020; VUONG et al., 2014). Contudo, a necessidade crescente no aperfeiçoamento da estratificação de risco e na determinação precisa do prognóstico, além da compreensão exata da biologia tumoral, tem levado ao desenvolvimento de muitos ensaios multigênicos, tais como *Oncotype DX*, *Prosigna PAM50* e *Mammaprint* (BERNARD et al., 2009; PAIK et al., 2004; VIJVER et al., 2002).

HER2+: Representa 15 a 20% dos casos de câncer de mama recém-diagnosticados (CHO, 2016). De acordo com a última atualização de St. Gallen em 2013 definiu-se o perfil imuno-histoquímico deste subtipo pela elevada expressão de HER2 (>10%), negatividade para ER (<1%) e PR (<20%) e alta expressão de Ki-67 (>20%) (GOLDHIRSCH et al., 2013). Além da caracterização imunofenotípica rotineiramente utilizada para avaliar o status de HER2 no câncer de mama, a técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) também tem sido empregada para avaliar a amplificação do gene (KRISHNAMURTI; SILVERMAN, 2014). A super expressão de HER2 ocorre quase que exclusivamente na variante pleomórfica do CLI (SIMPSON et al., 2008). A amplificação do gene e a expressão elevada da proteína HER2 têm sido relacionadas com tumores de maior grau histológico, alto índice proliferativo e propensões à metástase, acarretando na curta sobrevida livre de doença e pior prognóstico (FENG et al., 2018b; FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018). No entanto, estes tumores podem apresentar boa resposta a drogas que bloqueiam a atividade de HER2, especialmente os anticorpos monoclonais humanizados (*trastuzumab*) e inibidores de tirosina quinase do receptor molecular (*lapatinib*) (Tabela 1) (KRISHNAMURTI; SILVERMAN, 2014; TSANG; TSE, 2020).

Triplo Negativo (TN): Esta classe de tumores constitui 10 a 20% de todos os casos de câncer de mama (TSANG; TSE, 2020). Este subtipo é caracterizado pela falta de expressão dos receptores hormonais ER (<1%) e PR (<20%) e da oncoproteína HER2 ($\leq 10\%$), além disso, são tumores altamente proliferativos de acordo com o índice Ki-67 (>30%) (GOLDHIRSCH et al., 2013). A maioria dos tumores TN se manifesta como o tipo histológico CDI-NTE, contudo, também incluem variantes de carcinomas medulares, metaplásicos e apócrinos (FENG et al.,

2018b). Estes tumores geralmente são mais prevalentes em portadores de mutações em BRCA1 e mulheres jovens, apresentando maior grau histológico, risco de recidiva loco-regional, doença contralateral e recaída sistêmica (HAFFTY et al., 2006; KUMAR; AGGARWAL, 2016; YERSAL, 2014). Muitos estudos de perfil de expressão gênica tem sido realizados para melhor compreender a heterogeneidade desta forma particularmente agressiva de câncer de mama, desta forma, os tumores TN podem ser ainda divididos em outras 7 entidades distintas, incluindo dois do tipo *basal-like* (BL1 e BL2), com padrão basal de expressão gênica, mas apresentando diferenças na resposta imune; um do tipo receptor de andrógeno luminal (LAR), que apresenta expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo de andrógenos; um do tipo imunomodulador (IM), que apresenta mudanças importantes na expressão de genes envolvidos em vias de sinalização imunológica; um do tipo *claudin-low* (CL), caracterizados pela baixa expressão de proteínas de junções celulares (claudinas 3, 4 e 7, além de E-caderina); e por fim, dois do tipo mesenquimal, sendo eles, mesenquimal propriamente dito (M) e *mesenchymal stem-like* (MSL), ambos apresentando regulação positiva das vias de sinalização envolvidas na EMT (*epithelial mesenchymal transition*), mas diferindo na sinalização de genes associados a células-tronco e de fatores angiogênicos (LEHMANN et al., 2011, 2016; PRAT; PEROU, 2011; SABATIER et al., 2014). Apesar de sua definição simples, este subtipo tem sido um desafio para a clínica, devido a sua heterogeneidade morfológica, molecular e clínica e pela falta de terapias direcionadas (RUSSNES et al., 2017). O tratamento não cirúrgico do subtipo TN tem sido limitado a quimioterapia a base de platina e inibidores de PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) para portadores de mutações em BRCA1 e 2 (Tabela 1) (FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018; YAM; MANI; MOULDER, 2017).

Luminais: Os tumores luminais, classicamente reconhecidos por seu status positivo para ER, têm sua origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ductos-lobulares, correspondendo entre 70 e 80% dos casos de câncer de mama (TSANG; TSE, 2020). O grupo Luminal A, é a entidade molecular mais frequente e compreende aproximadamente a metade dos casos de câncer de mama recém-diagnosticados (MAKKI, 2015). O perfil imuno-histoquímico deste subtipo foi definido como: ER+ ($\geq 1\%$), alta expressão de PR ($\geq 20\%$), HER2- ($\leq 10\%$) e baixos níveis de Ki-67 ($< 14\%$) (GOLDHIRSCH et al., 2013). Além disso, estes tumores apresentam elevada expressão de citoqueratinas 7/8/18/19 (GAO; SWAIN, 2018). Incluem uma ampla gama de variantes de baixo grau histológico, tais como CDI-NTE, carcinoma tubular, cribriforme, mucinoso e CLI clássico (GAO; SWAIN, 2018; VUONG et al., 2014). Este subtipo tem sido associado a um prognóstico altamente favorável, com curso clínico mais indolente e geralmente mostrando menor comprometimento linfonodal (CIRIELLO et al.,

2013; GARCÍA FERNÁNDEZ et al., 2014). Além disso, devido ao status positivo dos receptores hormonais, as pacientes se beneficiam das terapias endócrinas, seja com moduladores seletivos do receptor de estrógeno (tamoxifeno) ou com inibidores de aromatase (anastrozol) (Tabela 1) (ROCCA et al., 2015). Já os tumores do tipo Luminal B, são responsáveis por aproximadamente 20 a 30% dos casos de câncer de mama invasivo (YERSAL, 2014). Este subtipo pode ser categorizado imunofenotipicamente em Luminal B (HER2-): ER+ ($\geq 1\%$), PR- ou $< 20\%$, HER2- ($\leq 10\%$) e altos níveis de Ki-67 ($\geq 20\%$) ou Luminal B (HER2+): ER+ ($\geq 1\%$), HER2+ ($> 10\%$) e qualquer nível de PR e Ki-67 (GOLDHIRSCH et al., 2013). A expressão das citoqueratinas de baixo peso molecular das células epiteliais luminais é uma regra (FENG et al., 2018b). Esta entidade molecular geralmente apresenta grau histológico moderado, incluindo a maior parte dos CDI-NTE e associado a um prognóstico intermediário, com maiores propensões a recidiva loco-regional quando comparado ao Luminal A (TSOUTSOU et al., 2017; VUONG et al., 2014). O subtipo Luminal B é compreendido como a forma mais agressiva dos casos de câncer de mama ER+ e muitas vezes não apresentam benefícios para a terapia hormonal (Tabela 1) (CREIGHTON, 2012; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018). A principal diferença no aspecto molecular entre os dois subgrupos luminais é o aumento da expressão de genes relacionados à proliferação celular, como o NSE1 (*nuclease sensitive element binding protein 1*) e ciclina E1 (CCNE1), além da ativação de certas vias alternativas de fatores de crescimento, como PI3K (*phosphatidylinositol 3-Kinase*) e Src (*sarcoma proto-oncogene*) nos tumores de mama Luminal B (HARBECK et al., 2019; YERSAL, 2014).

Tabela 1: Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama.

Subtipos Moleculares	Luminal A	Luminal B	HER2+	TN
Biomarcadores	ER+ PR+ HER2- Ki67baixo	ER+ PR+/- HER2+/- Ki67alto	ER- PR- HER2+ Ki67alto	ER- PR- HER2- Ki67alto
Frequência de Casos	40 – 50%	20 – 30%	15 – 20%	10 – 20%
Grau Histológico	Baixo (Grau I)	Moderado (Grau II)	Alto (Grau III)	Alto (Grau III)
Prognóstico	Bom	Intermediário	Ruim	Ruim
Sobrevida (5 anos)	85%	70 – 80%	60%	40 – 50%
Resposta às Terapias	Endócrina	Endócrina Quimioterapia	Terapia Alvo Quimioterapia	Quimioterapia Inibidores de PARP

ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; HER2, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano. Criado pelo autor, baseado nos artigos de: CHO, 2016; FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018; VUONG et al., 2014.

Apesar dos grandes avanços na estratificação dos subtipos do câncer de mama, o maior obstáculo encontrado atualmente na oncológica clínica tem sido a completa compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da heterogeneidade desta neoplasia, impactando na adversidade do diagnóstico e prognóstico preciso e no enfraquecimento de estratégias em medicina personalizada (FENG et al., 2018b; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013). Devido a incrível heterogeneidade intertumoral (ilustrada pelo tamanho tumoral, status dos linfonodos regionais, metástases distantes e diferenças na sobrevida) e principalmente heterogeneidade intratumoral (ilustrada pela variabilidade histológica e biomolecular, alterações cromossômicas, genômicas, metabólicas e epigenéticas, além da plasticidade celular e o microambiente tumoral), tem constituído importantes dilemas na classificação e interpretação do câncer de mama, surgindo as seguintes perguntas: (1) quantos subtipos desta neoplasia maligna existem? (2) qual sistema de classificação molecular é mais robusto? (3) as classificações são capazes de ilustrar a heterogeneidade intratumoral e evolução clonal? (4) como devemos interpretar os subtipos de câncer de mama? e (5) é possível e viável que existam diferentes esquemas de classificação na prática clínica? (ELLSWORTH et al., 2017; SONG; MERAJVER; LI, 2015; TURASHVILI; BROGI, 2017). Além disso, a resistência a múltiplas

drogas (MDR) tem sido considerado o maior obstáculo no tratamento sistêmico do câncer de mama, tornando a doença por muitas vezes incontrolável e levando a altas taxas de mortalidade (CALAF et al., 2015). Os mecanismos subjacentes à resistência aos medicamentos ainda são pouco compreendidos, contudo, sabe-se que a resistência anti-apoptótica, as bombas de efluxo de drogas dependentes de ATP, alterações nos alvos de medicamentos, alterações epigenéticas, EMT e miRNAs, compõem importantes fatores para as falhas nas terapias anti-câncer (HOLOHAN et al., 2013; HOUSMAN et al., 2014). Neste contexto, centenas de outros candidatos a biomarcadores têm sido investigados e estudados para potenciais implicações no diagnóstico, prognóstico, alvos de drogas e preditor de resposta terapêutica (AKRAM et al., 2017; HARBECK et al., 2019).

1.4 Membros da Família PHLDA (*Pleckstrin homology-like domain family A*)

Os membros da família PHLDA são conservados evolutivamente entre as espécies e compreendem um grupo de três genes localizados em diferentes cromossomos: PHLDA1 (12q21.2), PHLDA2 (11p15.4) e PHLDA3 (1q32.1) (FRANK et al., 1999; KUSKE; JOHNSON, 2000; QIAN et al., 1997). Estes três genes compartilham semelhante organização genômica e codificam proteínas compostas majoritariamente pelo domínio funcional PHL (*pleckstrin homology-like*) (FRANK et al., 1999; SAXENA et al., 2002). Os domínios PHL consistem de 100 a 120 resíduos de aminoácidos e são encontrados em uma ampla gama de proteínas envolvidas na sinalização intracelular, podendo ainda, participar no rearranjo do citoesqueleto e tráfico da membrana (LEMMON, 2004; LEMMON; FERGUSON, 2000). Alguns destes domínios PHL tem sido bem categorizado como módulos moleculares de ligação a fosfatidilinositol localizados internamente na membrana celular, bem como outras proteínas com especificidade variada (LEMMON, 2007; YOON, 2014). A ligação de proteínas com o domínio PHL aos fosfatidilinositol é inicialmente impulsionada por interações eletrostáticas inespecíficas, seguida por uma ligação específica para atingir um direcionamento seletivo e aumentar o tempo de ligação (LEMMON, 2008; STAHELIN; SCOTT; FRICK, 2014). A capacidade dos domínios PHL de se ancorar transitoriamente na superfície da membrana intracelular e participar de múltiplos processos de transdução de sinais, têm sido alvo de muitos estudos (JIANG et al., 2015; SCHEFFZEK; WELTI, 2012). Alguns trabalhos tem demonstrado que proteínas com o domínio funcional PHL podem suprimir a atividade de AKT (*serine/threonine kinase 1*) pela interferência direta na ligação desta oncoproteína aos fosfatidilinositol, inibindo sua fosforilação e, conseqüentemente, ativação de vias de

proliferação e sobrevivência celular (DAI et al., 2012; FEARON et al., 2018; KAWASE et al., 2009). A desregulação da via AKT tem sido implicada em uma variedade de cânceres humanos e a identificação de potenciais inibidores desta via tem sido considerado uma estratégia promissora para tratamentos anti-câncer (PARIKH et al., 2012; SHARIATI; MERIC-BERNSTAM, 2019). A estrutura proteica de PHLDA2 e PHLDA3 consiste basicamente de um único domínio PHL, que se estende por quase toda a estrutura da proteína flanqueada por extensões curtas terminais (FRANK et al., 1999; SAXENA et al., 2002). A diferença de seus parálogos, PHLDA1 possui uma estrutura proteica muito maior, com o domínio PHL interrompido por estiramentos de poli-glutamina (QQ) e na região carboxi-terminal da proteína são encontradas sequências repetitivas de prolina-glutamina (PQ) e prolina-histidina (PH) (Figura 4) (NAGAI, 2014).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura modular das proteínas dos três membros da família PHLDA. A estrutura das proteínas PHLDA2 e PHLDA3 consistem de um único domínio PHL (*pleckstrin homology-like*), que se estende entre os resíduos de aminoácidos (aa) 7 a 99 e 5 a 123 respectivamente, flanqueados por extensões curtas terminais. A diferença destes, PHLDA1 possui o domínio PHL (resíduos entre 150 a 283 aa) interrompido por um trato de poli-glutamina (QQ) (resíduos entre 187 a 204 aa) e na região carboxi-terminal é composto por extensões ricas em prolina-glutamina (PQ) (resíduos entre 311 a 346 aa) e prolina-histidina (PH) (resíduos entre 352 a 389 aa). Criado pelo autor, baseado nos artigos de: FRANK et al., 1999; NAGAI, 2014; SAXENA et al., 2002.

Esta família de proteínas com o domínio PHL despertou interesse de nosso grupo de pesquisa inicialmente através de um trabalho realizado em 2003, que tinha por objetivo primário de identificar genes diferencialmente expressos em tumores de mama, quanto a presença ou ausência de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) utilizando a técnica de *differential*

display PCR (DD-PCR). Deste trabalho, diversos genes foram encontrados diferencialmente expressos e com potencial para serem investigados como biomarcadores em câncer de mama, dentre eles, o gene PHLDA1 (NAGAI et al., 2003). Estudos subsequentes de nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o gene PHLDA1 é um possível candidato a supressor tumoral e biomarcador em câncer de mama (BONATTO et al., 2017; MARCHIORI; CASOLARI; NAGAI, 2008; NAGAI et al., 2007; VALOYES, 2018). Apesar da importante associação dos membros da família PHLDA com diversos processos pró-apoptóticos (DAI et al., 2012; NEEF et al., 2002; TAKIKAWA; OHKI, 2017) e anti-proliferativos (KAWASE et al., 2009; OBERST et al., 2008; WANG et al., 2016), poucas pesquisas experimentais estão sendo direcionadas na busca de maiores investigações biológicas, moleculares e de impacto clínico dos membros desta família de proteínas no câncer de forma geral, e mais especificamente, em modelos de câncer de mama.

1.5 PHLDA1: Papel Biológico e Relação com o Câncer de Mama

O gene PHLDA1 (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 1*), também chamado de TDAG51 (*T – cell death – associated gene 51*), foi inicialmente identificado em hibridomas de células T de camundongos, revelando a capacidade deste gene em induzir apoptose através da estimulação da expressão de Fas (*first apoptotic signal*) (PARK et al., 1996). Quatro anos mais tarde o gene PHLDA1 foi mapeado por análise de radiação híbrida no cromossomo 12q15 humano (KUSKE; JOHNSON, 2000). Este gene contém dois éxons e um íntron, se estendendo por 6,3 kb de DNA genômico e transcrevendo um RNAm de 1,2 kb (FRANK et al., 1999; NAGAI, 2014). Diferentemente de seus parálogos (PHLDA2 e PHLDA3) que consistem quase que exclusivamente de um único domínio PHL, a proteína PHLDA1 apresenta uma grande estrutura modular e seu domínio PHL é interrompido por estiramentos de poli-glutamina (QQ), que estão frequentemente associados às proteínas reguladoras de transcrição, além disso, proteínas com repetições do tipo QQ estão relacionadas com o desenvolvimento de diversos transtornos neurodegenerativos hereditários (ADEGBUYIRO et al., 2017; LABBADIA; MORIMOTO, 2013; SHAO; DIAMOND, 2007). E na região carboxi-terminal da proteína são encontradas sequências repetitivas de prolina-glutamina (PQ) e prolina-histidina (PH) que possuem a capacidade de interações proteína-proteína, além de atuarem como ativadores transcricionais (FENG et al., 2018a; GOMES et al., 1999; WILLIAMSON, 1994). Alguns estudos experimentais revelaram que a proteína codificada pelo gene PHLDA1 apresenta um sítio de fosforilação putativo na serina-293 pela

atividade enzimática da proteinase quinase C (PKC) (GOMES et al., 1999; WANG et al., 1998). Além disso, para a indução eficiente da expressão de PHLDA1 as vias de sinalização de PKC e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) podem estar envolvidas (OBERG et al., 2004). Johnson e Colaboradores (2011) demonstraram que a proteína Aurora quinase A (AURKA) regula negativamente os níveis da proteína PHLDA1 pela fosforilação direta da serina-98 gerando sua degradação. A proteína PHLDA1 é amplamente expressa em diversos tecidos e sua localização sub-celular pode variar, encontrando-se predominantemente localizada no citoplasma, mas podendo se translocar para o núcleo pela presença putativa de um sinal de localização nuclear em sua estrutura modular, além disso, também pode ser encontrada na membrana celular (CHEN et al., 2018; HINZ et al., 2001; HOSSAIN et al., 2003; NAGAI et al., 2007; NEEF et al., 2002; ZHAO; LU; LIU, 2015).

A expressão de PHLDA1 pode ser induzida por diferentes estímulos externos e sua função pode variar de acordo com o tipo e contexto celular e tecidual, resultando em diferentes processos biológicos (NAGAI, 2016). Algumas evidências experimentais implicam o PHLDA1 em caminhos apoptóticos intrínsecos e extrínsecos (GOMES et al., 1999; HAYASHIDA et al., 2006; HOSSAIN et al., 2003; LIU et al., 2011; NEEF et al., 2002; PARK et al., 1996; WANG et al., 2018a), com funções antiproliferativas (EINBOND et al., 2012; OBERST et al., 2008) e para indução de processos autofágicos (DURBAS et al., 2016, 2018; MOAD et al., 2013), enquanto outros trabalhos apontaram o oposto ou ausência de qualquer relação (MURATA et al., 2014; OBERG et al., 2004; RHO et al., 2001; TOYOSHIMA et al., 2004; WU et al., 2010). Agentes indutores de estresse celular, como aqueles provocados pelo choque térmico, estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático, são capazes de induzir a expressão de PHLDA1 em diferentes tipos celulares (HAYASHIDA et al., 2006; HOSSAIN et al., 2003; JANUS et al., 2020; JOO et al., 2007; PARK et al., 2013), podendo levar a mudanças morfológicas, diminuição de adesão celular e promoção de anoikis, e que ainda sua expressão pode ser regulada positivamente por IGF-1 (*insulin-like growth factors 1*) (TOYOSHIMA et al., 2004; WU et al., 2010), pela via ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) (LYU et al., 2016; OBERST et al., 2008), pela quinase HER2 (FEARON et al., 2018; LI et al., 2014a; MAGI et al., 2018), pelo estrogênio via ER (KASTRATI; CANESTRARI; FRASOR, 2015; MARCHIORI; CASOLARI; NAGAI, 2008) e por p53 (CHEN et al., 2018). O PHLDA1 tem sido reportado por inibir síntese de certas proteínas e possivelmente exerce um papel na tradução proteica (HINZ et al., 2001; OBERG et al., 2004). A recuperação ou expressão transiente de PHLDA1 tem sido relatada por aumentar a sensibilidade de diferentes células tumorais ao tratamento (FEARON et al., 2018; LI et al., 2014a; NEEF et al., 2002). Além disso,

a super-expressão de PHLDA1 pode promover a EMT mediada por desregulação dos níveis de cálcio (CARLISLE et al., 2012). A expressão de PHLDA1 pode ser inibida pelos microRNAs miR-181a e b (KASTRATI; CANESTRARI; FRASOR, 2015) e miR-194 (LIU et al., 2019). Adicionalmente, PHLDA1 vem crescentemente sendo investigado como um marcador de células-tronco folicular em uma série de estudos (OHYAMA et al., 2006; SELLHEYER et al., 2013; SELLHEYER; KRAHL, 2011; YEH; MCCALMONT; LEBOIT, 2012).

Embora as exatas funções celulares e moleculares do PHLDA1 não tenham sido totalmente elucidadas, diversos estudos demonstram que este gene apresenta um importante papel no processo tumorigênico. A expressão reduzida de PHLDA1 já foi descrita em melanoma (NEEF et al., 2002), câncer de mama (BONATTO et al., 2017; CHEN et al., 2018; FEARON et al., 2018; JOHNSON et al., 2011; LI et al., 2014a; MAGI et al., 2018; MARCHIORI; CASOLARI; NAGAI, 2008; MOAD et al., 2013; NAGAI et al., 2007; OBERST et al., 2008), carcinoma oral (COUTINHO-CAMILLO et al., 2013), adenocarcinoma pulmonar (JOO et al., 2007), câncer gástrico (ZHAO et al., 2015), neuroblastoma (DURBAS et al., 2016), câncer de endométrio (FEARON et al., 2018) e carcinoma de ovário (CHEN et al., 2018). No entanto, PHLDA1 foi relatado regulado positivamente no câncer intestinal (CHIU et al., 2005; SAKTHIANANDESWAREN et al., 2011), carcinoma basocelular (EVANGELISTA; NORTH, 2015; LEBLEBICI et al., 2019; SELLHEYER et al., 2013; YEH; MCCALMONT; LEBOIT, 2012), câncer de mama (KASTRATI; CANESTRARI; FRASOR, 2015), carcinoma oral (MURATA et al., 2014) e osteossarcoma (REN et al., 2015). Esses achados sugerem que o PHLDA1 seja um gene pleiotrópico, podendo dispor de um papel supressor de tumor ou oncogênico dependendo do tipo e contexto tumoral (NAGAI, 2016).

Entre os membros da família PHLDA, o gene PHLDA1 é o que tem sido melhor investigado no processo de tumorigênese da mama. Por meio do trabalho pioneiro de nosso grupo de pesquisa publicado no ano de 2007, este gene foi incluído no radar de potenciais biomarcadores no câncer de mama (NAGAI et al., 2007). Neste estudo conduzido pelo nosso grupo, foi demonstrado que tumores de mama que apresentavam diminuição de expressão da proteína PHLDA1, estavam associados com fenótipos mais agressivos e de pior prognóstico (tanto em termos de sobrevida global, quanto em termos de sobrevida livre de doença). Curiosamente, pacientes com tumores de mama ER- com expressão positiva de PHLDA1 mostraram um desfecho clínico mais favorável, quando comparado com tumores de mama ER+ com expressão positiva para esta proteína (NAGAI et al., 2007). Em estudo subsequente de nosso grupo, foi avaliado o potencial de PHLDA1 em ser regulado por 17 β -estradiol (E2) via ER em células de câncer de mama MCF-7. As células MCF-7 que foram tratadas com o E2

apresentaram um aumento da expressão dos transcritos de PHLDA1 em mais de duas vezes em comparação as células controle. Além disso, o antiestrogênico (*fulvestrant*) inibiu a expressão do mRNA de PHLDA1, suprimindo completamente os efeitos de E2 na regulação da expressão deste gene alvo. Desta forma, indicando que o PHLDA1 possa ser regulado positivamente pelo E2 via ER (MARCHIORI; CASOLARI; NAGAI, 2008). Johnson e colaboradores (2011) observaram que a sub-regulação da proteína PHLDA1 em espécimes de tumores mamários, é um forte preditor de mau prognóstico em pacientes com câncer de mama. Adicionalmente, Kastrati e colaboradores (2015) demonstraram que PHLDA1 pode ser regulado por *crosstalk* entre ER e NF- κ B (*nuclear factor kappa B*). Além disso, descobriram que ER e NF- κ B atuam sinergicamente para a ativação transcricional direta de PHLDA1 e indiretamente na repressão do miR-181a e b, que regula negativamente PHLDA1.

Utilizando células epiteliais mamárias imortalizadas (HME16C) transformadas com mutantes dos domínios efetores de Ras (*rat sarcoma*), foi detectado um aumento de expressão do gene PHLDA1 correlacionado com a ativação persistente de ERK. Em crescimento independente de ancoragem, a redução de expressão de PHLDA1 promoveu aumento da proliferação celular, sugerindo que possa existir um *feedback* negativo que direta ou indiretamente esteja limitando a ativação da via ERK (OBERST et al., 2008). Moad e colaboradores (2013) observaram que a regulação positiva da expressão de PHLDA1 resultou na indução de autofagia em células de carcinoma mamário T47-D tratadas com rapamicina. Além disso, o PHLDA1 também apresentava aumento de expressão associado com a apoptose destas células tumorais, quando pré-incubadas com 3-metil-adenina (3-MA). Adicionalmente, o *knockdown* de PHLDA1 por siRNA culminou na diminuição da expressão de proteínas relacionadas com a apoptose e autofagia, sugerindo que o PHLDA1 possa mediar e regular positivamente ambos os processos celulares.

A partir de uma avaliação do perfil de expressão gênica em células de câncer de mama SKBR3 (HER2+) tratadas com lapatinib (inibidor dos receptores EGFR e HER2) foi identificado o PHLDA1 como um novo gene a jusante da sinalização de HER2. Além disso, foi determinado que a sobre-expressão de PHLDA1 foi capaz de inibir a atividade de AKT, resultando na redução da proliferação e migração celular e da capacidade clonogênica, sugerindo que a expressão reduzida de PHLDA1 possa ser importante na progressão do câncer de mama, bem como, na modulação da sinalização oncogênica de HER2 (LI et al., 2014a). Adicionalmente, Chen e colaboradores (2018) demonstraram que o *knockdown* de PHLDA1 em diferentes linhagens de células de câncer de mama MDA-MB-468, MCF-7 e HCC38, causou uma hiper ativação de AKT. De outro modo, a expressão elevada de PHLDA1 resultou

no bloqueio da atividade de AKT induzido por EGF (*epidermal growth factor*), além disso, o domínio central PHL foi determinado como imprescindível para ligação aos fosfatidilinositol localizados internamente a membrana celular, resultando na ligação competitiva e repressão da atividade desta oncoproteína.

Um ciclo regulatório entre AURKA e PHLDA1 também foi relatado em células de câncer de mama. Verificou-se que AURKA e PHLDA1 se regulam mutualmente de forma negativa em células cancerígenas de mama MDA-MB-231, além disso, a regulação positiva de PHLDA1 foi capaz de antagonizar as vias oncogênicas mediadas por AURKA, inibindo a motilidade, proliferação e transformação celular (JOHNSON et al., 2011). Magi e colaboradores (2018) demonstraram que PHLDA1 pode ser induzido transcricionalmente pela ativação do receptor ErBb3 (*human epidermal growth factor receptor 3*) mediado por hereglobulina (HRG) em células MCF-7. O estudo também revelou que o aumento da expressão de PHLDA1 pode impedir a oligomerização de ordem superior dos receptores ErBb (*human epidermal growth factor receptor*), inibindo indiretamente a fosforilação e ativação da quinase ErBb2 e resultando no controle da atividade desta rede de sinalização.

Em um trabalho elegante desenvolvido pelo grupo de Fearon (2018), foi descoberto o gene PHLDA1 mais diferencialmente sub-regulado em células de câncer endometrial com resistência a inibidores de FGFR (*fibroblast growth factor receptors*). Por meio de técnicas de fosfoproteoma, foi identificado um mecanismo compensatório acionado pela sinalização de AKT e sustentado pela regulação negativa de PHLDA1, que leva a resistência adquirida aos medicamentos direcionados a receptores tirosina quinase (RTK). Curiosamente, o *knockdown* de PHLDA1 foi suficiente para conferir resistência *de novo* a inibidores de RTK (*trastuzumab* e *lapatinib*) em linhagens cancerígenas de mama HER2+ (SKBR3/HCC1954/MCF-7-HER18), contudo, a re-expressão de PHLDA1 nessas linhagens resistentes foi suficiente para re-sensibilização das células aos inibidores de RTK. Portanto, este trabalho mostrou que a regulação negativa de PHLDA1 é um dos mecanismos pelo qual as células cancerosas se tornam capazes de desenvolver resistência às terapias direcionadas por RTK, além disso, PHLDA1 se revelou como um potencial biomarcador útil para identificar pacientes que podem ou não se beneficiar de terapias alvo direcionadas aos RTKs.

Em um trabalho anteriormente realizado pelo nosso grupo, onde foram realizadas minerações de dados públicos para avaliar o perfil de expressão gênica e potencial valor prognóstico de PHLDA1 em câncer de mama, foi revelado que os transcritos de PHLDA1 encontram-se significativamente reduzidos em amostras tumorais de mama comparada com o tecido normal adjacente. O gene PHDA1 apresentou-se mais expresso nos tumores TN e que a

alta expressão do gene neste subtipo conferiu pior prognóstico. Além disso, baixos níveis de expressão de mRNA para PHLDA1 foram correlacionados com diminuição da sobrevida livre de recaída nos subtipos luminais (VALOYES, 2018).

Nosso grupo de pesquisa também realizou um estudo para investigar o papel funcional de PHLDA1 em células epiteliais mamárias humanas não-malignas (MCF10A), na tentativa de dissecar se a expressão reduzida deste gene alvo, por si só, seria capaz de promover quaisquer alterações morfológicas e no comportamento biológico desta linhagem celular. Para isso foram gerados clones de células MCF10A com *knockdown* estável de PHLDA1. Foi demonstrado que a regulação negativa da expressão de PHLDA1 estava relacionada com o desenvolvimento de um fenótipo agressivo, induzindo alterações morfológicas marcantes, principalmente em mudanças no padrão de adesão célula-célula e reorganização do citoesqueleto. Além disso, as células com diminuição de expressão de PHLDA1 apresentaram maiores taxas proliferativas, capacidade migratória, habilidade clonogênica, aquisição de comportamentos invasivos e maior capacidade na formação de mamosferas quando comparado às células controle. Nesse sentido, estes resultados indicaram que a regulação negativa de PHLDA1 em células MCF10A leva a mudanças morfológicas significativas e um comportamento mais agressivo (BONATTO et al., 2017).

1.6 PHLDA2: Papel Biológico e Relação com o Câncer de Mama

O gene PHLDA2 (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 2*), também chamado de TSSC3 (*tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment candidate gene 3*) têm sido relacionado intimamente no crescimento inicial e no desenvolvimento da placenta e da maioria dos tecidos fetais (FRANK et al., 2002; SAXENA et al., 2002). Foi originalmente descoberto por um rastreio cromossômico que foi realizado na busca de identificar e caracterizar genes na região 11p15.5 do cromossomo humano, do qual, é considerada uma importante região de localização de genes supressores tumorais (HU et al., 1997; QIAN et al., 1997). Este gene consiste de 1.148 pares de bases, contém 2 éxons e 1 íntron e codifica um mRNA que possui 9,2 kb com uma região codificadora de 458 pb (FRANK et al., 1999, 2002; LEE; FEINBERG, 1998). Diferentemente de seus parálogos (PHLDA1 e PHLDA3), este gene exibe expressão monoalélica por *imprinting* genômico, com expressão preferencial do alelo materno (FRANK et al., 1999; LEE; FEINBERG, 1998). Foi descrito como o primeiro gene pro-apoptótico regulado por *imprinting* genômico, abundantemente expresso em tecidos placentários e de fígado, recebendo a denominação inicial de Ipl (*imprinted in placenta and liver*)

(QIAN et al., 1997). Não obstante, Lee e colaboradores (1998) encontraram expresso em quase todos os tecidos fetais testados através da técnica de *Northern Blot*, exceto no coração e nos testículos. Sabe-se que os genes impressos desempenham papel importante no desenvolvimento humano inicial, atuando como fatores de crescimento ou como reguladores de expressão gênica para controlar a embriogênese e placentogênese (BAJRAMI; SPIROSKI, 2016; MONK et al., 2019). O gene PHLDA2 codifica uma proteína de 152 aminoácidos com peso molecular de 17,1 kDa, apresentando localização sub-celular predominantemente citoplasmática e nuclear (DAI et al., 2012; SAXENA et al., 2002), mas também pode ser encontrado na membrana plasmática e citoesqueleto (WANG et al., 2018b).

A proteína codificada pelo gene PHLDA2 pode desempenhar diferentes papéis biológicos específicos de tipo celular e tecidual. Muitas evidências experimentais implicam a expressão de PHLDA2 na indução da apoptose, pelo aumento da liberação de inúmeros componentes mitocôndrias e pela inibição da atividade de membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (DAI et al., 2012; HUANG; DAI; GUO, 2012; JIN et al., 2016; LEE; FEINBERG, 1998; LI et al., 2014b), além disso, também foi relatado no controle da progressão do ciclo celular (JIN et al., 2015, 2016; WANG et al., 2016). A perda de expressão de PHLDA2 tem sido associada com aumento da motilidade e invasividade em determinadas linhagens tumorais, particularmente pela promoção da EMT via sinalização WNT (*int/Wingless family*) (LV et al., 2016). Foi identificado que PHLDA2 pode realizar uma interação intracelular funcional e estrutural com RanBP9 (*ran-binding protein 9*), funcionando cooperativamente como um complexo proteico para ativação de *anoikis* (DAI et al., 2016), indução de autofagia (ZHAO et al., 2018) e supressão da auto-renovação de células-tronco de osteossarcoma (YAN et al., 2017). A maquinaria epigenética da regulação de PHLDA2 tem disso amplamente investigada. O aumento da acetilação de H3K9 no *locus* de PHLDA2 tem aumentado de forma significativa os níveis de expressão deste gene alvo (TANG et al., 2007), além disso, já foram identificados dois microRNAs miR-148a (IDICHI et al., 2018) e miR-214 (LI et al., 2019), além de, uma enzima de DNA metil transferase EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) (LV et al., 2015) como reguladores negativos para expressão deste gene. Adicionalmente, atividade de PHLDA2 pode ser modulada negativamente por hipóxia (KIM et al., 2007) e positivamente pela sinalização oncogênica EGFR/ErbB2 (WANG et al., 2018b).

Apesar de serem escassas as pesquisas com os mecanismos moleculares da regulação transcricional e o papel funcional de PHLDA2 frente ao processo tumorigênico, alguns estudos tem relatado que a expressão reduzida de PHLDA2 foi observada em tumores de Wilms (SCHWIENBACHER et al., 2000), câncer de mama (WANG et al., 2018b), tumores

intracranianos (MULLER et al., 2000), adenocarcinoma pulmonar (WANG et al., 2018b) e osteossarcoma (DAI et al., 2012, 2016; HUANG; DAI; GUO, 2012; LI et al., 2014b, 2019; LV et al., 2015, 2016; WANG et al., 2016; YAN et al., 2017; ZHAO et al., 2018) e, contrariamente, PHLDA2 foi descrito regulado positivamente no adenocarcinoma pulmonar (HSU et al., 2017), carcinoma colorretal (SUNAMURA et al., 2016), câncer de mama (MOON et al., 2015), osteossarcoma (LI; MENG; GUO, 2008) e câncer pancreático (IDICHI et al., 2018).

Neste momento existem poucas evidências experimentais que descrevam o potencial papel da expressão de PHLDA2 no processo tumorigênico das mamas. No trabalho conduzido pelo grupo de Moon (2015) para avaliação do perfil de expressão gênica associado aos tumores de mama TN enxertados com sucesso em modelos de PDX (*patient-derived xenograft*), foi revelado um conjunto de genes que poderiam estar envolvidos na progressão tumoral, metástase e piores desfechos clínicos, dentre eles, o gene PHLDA2 se apresentou significativamente supra-regulado. Quando testado em um grande painel de linhagens de células de câncer de mama, PHLDA2 exibiu alta expressão, principalmente em linhagens do subtipo TN. O *knockdown* de PHLDA2 em células de câncer de mama MDA-MB-231, resultou em redução significativa na migração e proliferação celular. Apesar de iniciais, estes dados podem fornecer *insights* de que PHLDA2 seja um potencial biomarcador prognósticos em câncer de mama TN (MOON et al., 2015).

Nosso grupo revelou por *data mining* que diferentemente de seus parálogos da família PHLDA, o gene PHLDA2 apresenta-se significativamente mais expresso em amostras de tecidos tumorais do que em tecido saudável da mama, além disso, o perfil de metilação revelou que amostras tumorais apresentam menores taxas de metilação em comparação as amostras normais da mama. Os resultados deste estudo também mostraram que altos níveis de expressão de PHLDA2 estava associado a subtipos com fenótipos mais agressivos, tais como HER2+, sugerindo PHLDA2 como preditor de mau prognóstico. Interessantemente, tumores com perfil imunofenotípico Luminal A que apresentam escasses para a oncoproteína HER2 e que exibem melhor prognóstico, a expressão de mRNA para PHLDA2 é reduzida. A análise com dados do KM Plotter revelaram que níveis aumentados da expressão de PHLDA2 foram associados com menores taxas cumulativas de sobrevida geral e sobrevida livre de recaída nos subtipos TN e luminais (VALOYES, 2018).

1.7 PHLDA3: Papel Biológico e Relação com o Câncer de Mama

O gene PHLDA3 (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 3*) foi inicialmente clonado como o seu parálogo mais próximo de murino PHLDA2, no qual, identificaram sua homologia com os membros de proteínas da família PHLDA e recebendo a denominação de Tih1 (*TDAG/Ipl homolog-1*) (FRANK et al., 1999). O PHLDA3 foi mapeado no cromossomo humano 1q32.1 e consiste de 4.888 pares de bases (FRANK et al., 1999; SAXENA et al., 2002). Este gene contém três éxons e um íntron e codifica um RNAm de 2,74 kb com uma região codificadora de 383 pb (SAXENA et al., 2002). A proteína codificada pelo gene PHLDA3 consiste de 127 aminoácidos, com peso molecular de 13,9kDa e notavelmente representa a estrutura modular mais simples entre os membros da família PHLDA, composta quase que exclusivamente de um único domínio PHL com pequenas extensões N e C terminais (FRANK et al., 1999; SAXENA et al., 2002). Foi demonstrado pelas técnicas de RNAseq e ensaios de imunocoloração que PHLDA3 é amplamente expresso em diversos tecidos humanos (FAGERBERG et al., 2014; MUROI et al., 2015). De acordo com ensaios de ligação *in vitro*, a proteína PHLDA3 se liga a uma ampla combinação de fosfatidilinositol com maior especificidade do que os outros membros da família PHLDA, desta forma, localizando-se primariamente na membrana celular, mas também pode ser encontrada no conteúdo citoplasmático e nuclear (KAWASE et al., 2009; MUROI et al., 2015; TAKIKAWA; OHKI, 2017).

Embora o PHLDA3 venha sendo relacionado com múltiplos processos pró-apoptóticos, seus exatos mecanismos moleculares, vias críticas regulatórias e papéis biológicos em diferentes tipos e contextos celulares ainda permanecem a serem totalmente elucidados. Uma grande parte das evidências experimentais implicam PHLDA3 como um possível gene alvo direto de p53 para indução e ativação de apoptose (APOSTOLIDIS et al., 2012; KAWASE et al., 2009; KERLEY-HAMILTON et al., 2005; LESZCZYNSKA et al., 2015; PAPPAS et al., 2017; TAKIKAWA; OHKI, 2017) e que sua expressão é induzida em resposta a eventos de estresse celular, como danos no DNA (APOSTOLIDIS et al., 2012; KERLEY-HAMILTON et al., 2005), hipóxia (HAMMOND; DORIE; GIACCIA, 2003; LESZCZYNSKA et al., 2015; MCKEOWN, 2014; SAKATA et al., 2017; YUN; GLAZER, 2015), desequilíbrio energético (HAN et al., 2016), ROS (*reactive oxygen species*) (BENSELLAM et al., 2019; QIAO et al., 2017) e estresse do retículo endoplasmático (BENSELLAM et al., 2019; HAN et al., 2016). Além disso, PHLDA3 se mostrou supra-regulado em resposta a exposição a radiações gama

(AMUNDSON et al., 2003; KAWASE et al., 2009) e por tratamentos com cisplatina (KERLEY-HAMILTON et al., 2005; LEE et al., 2015) e doxorrubicina (KAWASE et al., 2009). Muitos estudos toxigenômicos utilizando diferentes linhagens celulares têm destacado PHLDA3 como um potencial biomarcador de citotoxicidade e genotoxicidade (EICHNER et al., 2014; FURIHATA et al., 2018; HIBI et al., 2013; SUENAGA et al., 2013; WATANABE et al., 2012). Adicionalmente, PHLDA3 vem sendo implicado no processo de embriogênese, assim como, seu parálogo PHLDA2 (DAY; JAGADEESWARAN, 2009; QIAO et al., 2017; WANG et al., 2018c). A proteína supressora de tumor p53 é uma molécula com um importante papel na indução a parada de crescimento e morte celular, reparo do DNA e senescência e que sua função central é a transativação de genes alvos para executar funções supressoras tumorais (AGRAWAL; DHRUV; MESHRAM, 2017; PAPPAS et al., 2017), dentre eles o gene PHLDA3, em que, o mecanismo por trás da indução da morte celular por PHLDA3 tem sido associado vigorosamente ao seu domínio funcional PHL, impedindo a ligação de AKT as diferentes formas de fosfatidilinositol, consequentemente, inibindo sua fosforilação e ativação para vias de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência e proliferação celular (KAWASE et al., 2009).

O gene PHLDA3 tem disso reportado como um potencial candidato a supressor tumoral, visto que, pode comunicar-se com duas moléculas chave p53 e AKT que regulam a morte e a sobrevivência celular, respectivamente (FERREIRA; NAGAI, 2020). A expressão reduzida de PHLDA3 já foi descrita em câncer de pulmão (KAWASE et al., 2009; LESZCZYNSKA et al., 2015; OHKI et al., 2014), leucemia mieloide aguda (MATTESS et al., 2017), câncer de próstata (MAHAPATRA et al., 2012; OHKI et al., 2014), carcinoma de células escamosas do esôfago (MUROI et al., 2015), câncer de mama (CHRISTGEN et al., 2012; PAPPAS et al., 2017), tumor neuroendócrino pancreático (OHKI et al., 2014; TAKIKAWA; OHKI, 2017), carcinoma colorretal (KAWASE et al., 2009; LESZCZYNSKA et al., 2015; OHKI et al., 2014), carcinoma embrionário humano derivado de células germinativa testiculares (KERLEY-HAMILTON et al., 2005) e glioblastoma (KAWASE et al., 2009). Até o presente momento, não existem estudos que relacionem o aumento de expressão de PHLDA3 tanto em nível de transcritos quanto de proteínas com algum tipo de câncer.

Atualmente, poucas evidências experimentais foram realizadas quanto ao perfil de expressão e o potencial valor prognóstico de PHLDA3 em câncer de mama. Pappas e colaboradores (2017) utilizando a técnica do Chip-seq para p53 na ausência de estresse celular agudo descobriram que apenas p53 do tipo selvagem pode transativar vários genes supressores tumorais, dentre eles, o gene PHLDA3 e que uma mutação em TP53 pode causar o

desenvolvimento tumoral devido à perda de expressão desses genes alvo de TP53 basal. Em uma abordagem para avaliar o perfil de genes responsivos a p53, o grupo de Christgen (2012) utilizou duas linhagens de células de câncer de mama humano IPH-926 e BT-474 das quais abrigam uma mutação *missense* homozigótica em TP53 que codifica o raro mutante endógeno (*ts-p53 E285K*), facilitando a reconstituição da atividade endógena de p53 selvagem com mudanças de temperatura *in vitro* e consequentemente avaliação das alterações transcricionais associadas à restauração da função de p53. Um dos genes que foram fortemente induzidos pela atividade de p53 foi o PHLDA3. Adicionalmente, a expressão dos transcritos de PHLDA3 foi examinada em uma coleção de 46 amostras de câncer de mama lobular infiltrativo, visto que, a baixa ou ausência expressão de PHLDA3 estava associado claramente quando avaliado por IHC com o acúmulo de p53 nuclear ou com uma fraca ou dispersa imunorreatividade, indicativo de mutações deletérias em TP53. Portanto, esses resultados fornecem evidências de que o estado mutacional de p53 desregula a expressão de PHLDA3. Além disso, o grupo de Kawase (2009) constataram que a super-expressão de p53 induz aumento de expressão de PHLDA3 em linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-468.

Nosso grupo realizou análises *in silico*, a fim de, avaliar o padrão de expressão gênica de PHLDA3 e potencial valor prognóstico em câncer de mama. A análise de dados públicos de expressão nas plataformas TCGA, GEO e GOBO revelaram que tumores de mama apresentaram expressão reduzida de PHLDA3 em relação ao tecido normal adjacente, da mesma forma, a análise de metilação mostrou que no grupo de amostras de tumores de mama a frequência de metilação é maior do que no grupo de amostras de tecido saudável. O gene PHLDA3 apresentou-se com maior expressão em tumores ER+ e com menor nível de expressão nos casos TN. A redução de expressão gênica de PHLDA3 foi associada com uma pior sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama entre todos os subtipos moleculares (VALOYES, 2018).

Portanto, o objetivo central deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA em uma grande coorte de amostras de pacientes com câncer de mama e estimar o potencial valor prognóstico desses candidatos a biomarcadores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

➤ Avaliar o perfil de expressão proteica dos membros da família PHLDA (*pleckstrin homology like domain family A*) e seu potencial valor prognóstico em câncer de mama.

2.2 Objetivos Específicos

✓ Determinar o perfil de expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA (PHLDA1, PHLDA2 e PHLDA3) em *Tissue microarrays* (TMAs) contendo espécimes de tumores primários de mama.

✓ Investigar a associação entre a expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA com as taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença das pacientes.

✓ Correlacionar os dados de expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA com as variáveis demográficas e clínico-patológicas das pacientes.

✓ Estimar o potencial valor prognóstico e preditivo dos membros da família PHLDA para resposta ao tratamento das pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e Espécimes Tumorais

Este estudo retrospectivo foi baseado em uma coorte de 574 espécimes de tumores de mama fixadas em formol e embebidas em parafina, obtidas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil. Foram cedidos cinco blocos de TMAs (*Tissue Microarray*) que foram anteriormente confeccionados (conforme descrito abaixo) para nossa avaliação imuno-histoquímica. Os critérios de inclusão foram: diagnóstico histológico confirmatório de carcinoma mamário invasivo sem outras especificações, sexo feminino, disponibilidade de dados demográficos, informações clínico-patológicas, detalhes do tratamento e de seguimento clínico. Foram excluídos casos que exibiam apenas lesões *in situ*, núcleos de tecidos com <10% de células tumorais representativas, *spots* gastos ou inexistentes e casos com dados incompletos para os biomarcadores moleculares clássicos do câncer de mama (ER/PR/HER2). Além disso, devido à baixa frequência de casos subtipados como HER2+ e TN, não condizente com a distribuição por subtipo molecular da população feminina brasileira (CARVALHO et al., 2014), estes também foram excluídos de nossa análise. A Figura 5 resume nosso desenho do estudo seguindo as diretrizes definidas por REMARK (SAUERBREI et al., 2018). Na tabela abaixo são mostradas as características demográficas, clínico-patológicas e informações relativas ao tumor das 493 pacientes com câncer de mama do subtipo luminal incluídas neste estudo (Tabela 2). O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (CAAE: 04657018.2.0000.0065).

Figura 5: Delineamento experimental. Amostras de 574 casos de carcinoma mamário foram obtidas do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo Cancer Center. Todos os casos com dados incompletos para os biomarcadores moleculares (ER/PR/HER2) e classificados em HER2+ e TN foram excluídos de nosso estudo (n=81). Casos decorrentes de baixa representatividade de células tumorais, *spots* gastos ou inexistentes para os três membros da família PHLDA, também foram excluídos de nosso estudo (PHLDA1 n=158 / PHLDA2 n=190 / PHLDA3 n=217). Desta forma, amostras de um total de 335 casos de câncer de mama para PHLDA1, 303 casos para PHLDA2 e 276 casos para PHLDA3, foram submetidas a análise quantitativa usando um sistema de imunodeteção digital QuPath (*Quantitative Pathology*), algoritmo personalizado, preciso, automatizado, com dados de imuno-expressão reproduzíveis e validado por um médico patologista experiente. Ao final, foram correlacionados os dados de imuno-expressão com as características clinico-patológicas, variáveis demográficas e com a sobrevida global e sobrevida livre de doença das pacientes.

Tabela 2: Características demográficas e clínico-patológicas das 493 pacientes com câncer de mama do subtipo luminal incluídas no estudo.

Variáveis	Categorias	Quantidade	Frequência (%)
Idade	<50	160	32,5
	≥50	331	67,1
	ND	2	0,4
Tamanho do Tumor	T1 + T2	401	81,4
	T3 + T4	46	9,3
	ND	46	9,3
Comprometimento Linfonodal	pN0	270	54,8
	PN+	150	30,4
	ND	73	14,8
Presença de Metástase	pM0	415	84,2
	pM+	16	3,2
	ND	62	12,6
<i>Scarff-Bloom-Richardson</i> (SBR)	Grau 1	127	25,8
	Grau 2	251	50,9
	Grau 3	108	21,9
	ND	7	1,4
Estadiamento Clínico	Estágio Precoce	342	69,3
	Estágio Tardio	89	18,1
	ND	62	12,6
Grau Nuclear	Grau 1	38	7,7
	Grau 2	199	40,4
	Grau 3	251	50,9
	ND	5	1
Receptor de Estrógeno	Negativo	9	1,8
	Positivo	484	98,2
Receptor de Progesterona	Negativo	64	13
	Positivo	428	86,8
	ND	1	0,2
HER2	Negativo	414	84

	Positivo	74	15
	ND	5	1
	Não	100	20,3
Resposta à Hormonioterapia	Sim	372	75,4
	ND	21	4,3

ND, não determinado. HER2, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano.

3.2 Construção dos *Tissue Microarrays* (TMAs)

Nossa coorte consistiu em 493 amostras de câncer de mama do subtipo luminal dispostas em cinco blocos de TMAs, que foram confeccionadas anteriormente por conveniência. As lâminas de TMAs foram confeccionadas e gentilmente fornecidas pelo Serviço de Patologia do Hospital AC Camargo. As lâminas de TMAs foram confeccionadas e gentilmente fornecidas pelo serviço de Patologia do Hospital A.C. Camargo. Resumidamente, os espécimes de tecidos tumorais de mama emblocados em parafina foram recuperados, seccionados, corados com H&E (hematoxilina-eosina) e examinados por microscopia óptica (*Olympus CX 31*) para seleção de áreas viáveis e morfológicamente representativas. A área de interesse foi circulada usando um marcador permanente. Amostras cilíndricas de 1mm foram extraídas dos blocos doadores utilizando uma matriz de tecido manual (*Tissue microarrayer – Beecher Instruments*, Silver Spring, MD, EUA) e inseridas em ordem com espaçamento entre *spots* de 0,2mm nos blocos receptores. Cada caso foi amostrado duas vezes e todos os *spots* de tecidos foram distribuídos em cinco novos blocos e armazenados a 4°C. Um mapa com a identificação detalhada de cada *spot* foi elaborado em uma planilha Excel®, de modo que cada um dos casos (pacientes) fosse investigado com precisão. Posteriormente, secções de 4µm foram cortadas com um micrótomo dos blocos de TMAs e transferidas para lâminas revestidas por uma fita adesiva para posterior reticulação UV (*Instrumedics Inc, Hackensack, NJ, EUA*) (Figura 6). As secções foram mergulhadas numa camada de parafina para evitar a oxidação e mantidas em freezer à -20°C. Também foram coletados tecidos mamários saudáveis utilizados como controle negativo. As lâminas contendo os casos foram retiradas do freezer 24h antecedentes do procedimento de imuno-histoquímica (IHQ).

Figura 6: Esquema representativo da construção dos *Tissue microarrays* (TMAs). Os TMAs foram construídos usando um perfurador de tecidos. Os cilindros de amostras foram transferidos do bloco doador para o bloco receptor. Uma vez que o bloco de estudo tenha sido preparado, o bloco foi seccionado e corado com H&E para uso como lâmina de referência para confirmar histopatologia das amostras ou corados com os anticorpos de interesse para avaliação dos potenciais biomarcadores. Adaptado de Manley e colaboradores 2001.

3.3 Coloração Imuno-histoquímica (IHQ)

Para a imunocoloração, cada lâmina com os TMAs parafinados em secções de 4µm de espessura foram encubadas à 65°C durante 24h. As lâminas foram lavadas várias vezes com xileno para solubilizar e remover a parafina presente nas secções e, em seguida, reidratadas ocorrendo na seguinte ordem: 2x Xilol (10 minutos); 1x Etanol 100% (10 minutos); 1x Etanol 95% (5 minutos); 1x Etanol 70% (5 minutos); 2x ddH₂O (5 minutos). Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada usando tampão de citrato de sódio 10mM pH 6,0 em vapor de 95°C, conforme descrito anteriormente por Norton e colaboradores (1994). Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,4 por 5 minutos e lavadas por 3 vezes apenas com PBS. Cada lâmina de TMA foi corada com anticorpos para os 3 membros da família PHLDA (PHLDA1, 2 e 3), no qual, a diluição dos anticorpos foi definida utilizando amostras positivas bem caracterizadas e o sistema de visualização foram otimizados, conforme descrito na Tabela 3. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com PBS (3x – 5 minutos) e as imunorreacções foram detectadas com uma solução de diaminobenzidina (*J. T. Baker*, 9224-03, Center Valley, PA, EUA) e peróxido de hidrogênio a 6%. Ao final do

processo de imunocoloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada e contra-coradas com *Hematoxilina de Harris* por 20 segundos e, por fim, estas lâminas foram novamente desidratadas na seguinte ordem: 1x Etanol 70% (10 minutos); 1x Etanol 95% (5 minutos); 1x Etanol 100% (5 minutos); 2x ddH₂O (5 minutos); 2x Xilol (10 minutos); Xilol de montagem. Para a montagem das lâminas foram adicionadas de 1 a 2 gotas de *Entellan neu* (Merck, 1.07961, Darmstadt, Alemanha), posicionado a lamínula sobre a secção de TMA e selada com verniz transparente ou selante comercial para evitar danos as amostras. Os tecidos de controle positivo consistiam de placenta e fígado normal, conhecidos por expressar cada um dos antígenos de interesse. Todas as lâminas imunomarcadas foram digitalizadas na Plataforma *Aperio ScanScope CS* (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA, USA) com ampliação de 20x. As reações imunohistoquímicas foram feitas pelo serviço de Patologia do Hospital A.C. Camargo. As reações imunohistoquímicas foram feitas pelo Serviço de Patologia do Hospital AC Camargo.

Tabela 3: Anticorpos utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica e respectivas diluições.

Anticorpo	Clone	Titulação	Fabricante/Código
PHLDA1	Policlonal de Bode	1:100	(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; catálogo sc-6142)
PHLDA2	Policlonal de Coelho	1:50	(OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA; catalogo ta-344404)
PHLDA3	Policlonal de Coelho	1:100	(OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA; catalogo ta-315261)

3.4 Avaliação de Imunomarcção

Todas as análises de imagens foram realizadas usando o software de patologia digital QuPath (BANKHEAD et al., 2017). A análise quantitativa da expressão citoplasmática de PHLDA1 e PHLDA2 e a expressão nuclear, perinuclear e citoplasmática de PHLDA3 foram avaliadas e pontuadas em células tumorais, sem o conhecimento prévio dos detalhes clínicos de nossa coorte e o desfecho clínico das pacientes, conforme diretrizes da REMARK (SAUERBREI et al., 2018). Em resumo, o fluxo de nosso trabalho compreendeu a estimativa de pontuação para cada marcador, desenho do TMA, segmentação celular, computação de características e identificação de tipo celular com classificação de intensidade, sendo que, todas

as etapas tiveram assessoria de um patologista experiente. Todos os TMAs foram identificados usando a ferramenta “*dearrayer*” com a atribuição das grades e o mapa com ID de cada caso importado. Todos os núcleos de tecido foram detectados usando a ferramenta “*simple tissue detection*” de modo que todos os tecidos considerados insuficientes (<10% de células tumorais representativas no *spot*), com artefatos dominantes ou consistindo apenas de carcinoma ductal *in situ* foram removidos de nossa análise. Além disso, para os casos que foram considerados avaliáveis, mas que, apresentavam objetos confusos, marcação irregular e dobras de tecidos, foram removidos manualmente nesta etapa. As células foram identificadas usando o algoritmo personalizado “*cell detection*”. Um classificador de células foi treinado separadamente para cada marcador avaliado no estudo, definindo classe celular de tumor, estroma, necrose e infiltrado inflamatório, essa etapa foi acompanhado por um patologista experiente (Dr Ibere Soares), essa etapa foi acompanhada por um patologista experiente (Dr. Ibere Soares). Para cada marcador o sistema de classificação de células tumorais positivas foi otimizado com ajustes dos “*threshold*” (conforme necessário). O classificador de detecção para nossos marcadores foi aplicado em todos os conjuntos de dados (ou seja, todas as lâminas de TMAs escaneadas). Os resultados globais foram calculados em função da média a partir dos *spots* de tecidos em duplicata, casos que apresentavam no mínimo 1 *spot* e os tecidos que apresentavam >10% de células tumorais representativas. As taxas de expressão para os marcadores PHLDA2 e PHLDA3 foram calculadas com a porcentagem do número de células tumorais positivas (1+ fraco; 2+ moderado e 3+ forte marcação) em relação ao número total de células tumorais identificadas pelo algoritmo personalizado por densidade óptica. Ao final, as amostras foram categorizadas em *low* (0 e 1 >50%) e *high* (2 e 3 $\geq$ 50%), de acordo com a maior representatividade das células tumorais, utilizando um *cutoff* de 50%. Diferentemente de seus parálogos, PHLDA1 não se apresentou com diferentes intensidades de imuno-coloração, neste caso, utilizamos um ponto de corte simples para classificação das células tumorais (1+ marcação positiva; 0 marcação negativa). Ao final, nossos casos foram categorizados apenas como negativos (0 >30%) ou positivos (1+ $\geq$ 70%) para este marcador utilizando um *cutoff* de 70%.

3.5 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foram utilizadas informações demográficas, clínicas, anatomopatológicas e de seguimento clínico das pacientes tabuladas em uma planilha Excel®. Os dados categóricos foram avaliados usando o teste *Qui-quadrado* de Pearson ou exato de

Fisher, conforme apropriado, e apresentados na forma de tabelas de contingência. As probabilidades cumulativas de sobrevida global (*Overall Survival* – OS) e sobrevida livre de doença (*Disease-Free Survival* – DFS) foram estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* e as curvas de sobrevivência comparadas usando o teste *log-rank*. Os tempos de sobrevivência para a sobrevida global foram calculados a partir da data de cirurgia até o momento do óbito ou ultimo seguimento e para sobrevida livre de recaída, o desfecho foi à data da recidiva do câncer após a cirurgia ou final do seguimento. Uma diferença estatisticamente significativa foi predeterminada para os valores de $p < 0,05$. O *IBM SPSS Statistics* (versão 25.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para todas nossas análises.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão dos Membros da Família PHLDA em Tumores Primários de Mama

A expressão e localização sub-celular das proteínas dos membros da família PHLDA foram avaliadas por IHQ em um painel de 493 tumores primários de mama do subtipo Luminal. Como dito anteriormente, todos os casos decorrentes de baixa representatividade de células tumorais e *spots* gastos ou inexistentes para os três integrantes da família PHLDA foram excluídos de nossa análise, restando um “*n*” final variado para cada marcador do estudo: PHLDA1 (n=335), PHLDA2 (n=303) e PHLDA3 (n=276). As proteínas PHLDA1 e PHLDA2 foram predominantemente encontradas no citoplasma de células tumorais mamárias. Enquanto isso, a expressão de PHLDA3 foi identificada prevalentemente no núcleo, espaço perinuclear, mas também no citoplasma de células neoplásicas da mama. Postulado que a proteína PHLDA3 pode ser expressa em diferentes compartimentos em células tumorais da mama, realizamos a análise da expressão total de nosso marcador (ou seja, imunomarcacão nuclear e perinuclear + imunomarcacão citoplasmática de PHLDA3), neste modo de classificacão, foi levada em conta a distribuicão deste marcador por todos os compartimentos sub-celulares, onde é dividida a intensidade máxima pela intensidade média.

Observamos para a proteína PHLDA1 181 de 335 (54,1%) casos de câncer de mama com imuno-coloracão citoplasmática negativa. A IHQ revelou que a imunomarcacão citoplasmática de PHLDA2 foi considerada baixa em 188 dos 303 (62%) casos analisados. Por fim, foi identificada baixa imunorreatividade total da proteína PHLDA3 em 174 dos 276 (63%) casos analisados de câncer de mama. Imagens representativas da coloracão IHQ dos membros da família PHLDA em amostras de tumores de mama são mostradas na Figura 7.

Figura 7: Coloração imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA em amostras de câncer de mama. Fotomicrografias de tecidos representativos marcados com anticorpos para PHLDA1, 2 e 3. Exemplos de imunocoloração negativa e positiva para PHLDA1 (A) e *low* (baixo) e *high* (alto) para PHLDA2 e 3 (B, C, respectivamente) são mostrados.

4.2 Associação da Expressão Proteica dos Membros da Família PHLDA com Características Clínico-patológicas

Para avaliar a significância da expressão proteica dos membros da família PHLDA no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, comparamos algumas características clínicas e anatomopatológicas das pacientes com o status da expressão desta família de proteínas com o domínio PHL em nossa coorte de amostras de tumores primários de mama subtipados em luminais.

Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre o status da expressão citoplasmática de PHLDA1 e PHLDA2 quanto à idade, tamanho tumoral, comprometimento de linfonodos, presença de metástase, classificação SBR, estágio clínico, grau nuclear e resposta à terapia endócrina (Tabela 4). Para o último membro da família PHLDA, as evidências amostrais permitiram inferir que não existe associação estatisticamente significante entre o status da expressão total de PHLDA3 com nenhuma de nossas variáveis testadas, exceto uma ligeira associação com a resposta à terapia hormonal (*Qui-quadrado* $p=0,066$) (Tabela 4).

Tabela 4: Associação da expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA de acordo com fatores clínico-patológicos e marcadores biomoleculares em tumores luminais de mama.

Variáveis	Categorias	Expressão Citoplasmática			Expressão Citoplasmática			Expressão Total		
		PHLDA1		P value	PHLDA2		P value	PHLDA3		P value
		Negativo	Positivo		Low	High		Low	High	
Idade, n (%)	<50	64 (35,8)	56 (36,8)	0,837	66 (35,5)	46 (40)	0,431	69 (39,7)	35 (35)	0,445
	≥50	115 (64,2)	96 (63,2)		120 (64,5)	69 (60)		105 (60,3)	65 (65)	
Tamanho do Tumor, n (%)	T1 + T2	149 (93,1)	128 (90,1)	0,348	157 (92,4)	95 (89,6)	0,434	146 (91,8)	87 (92,6)	0,835
	T3 + T4	11 (6,9)	14 (9,9)		13 (7,6)	11 (10,4)		13 (8,2)	7 (7,4)	
Comprometimento Linfonodal, n (%)	pN0	98 (62,8)	80 (64,5)	0,770	105 (62,9)	51 (54,3)	0,173	90 (61,2)	51 (58,6)	0,694
	pN+	58 (37,2)	44 (35,5)		62 (37,1)	43 (45,7)		57 (38,8)	36 (41,4)	
Presença de Metástase, n (%)	pM0	151 (96,2)	130 (97,7)	0,515	160 (96,4)	94 (94,9)	1,000	145 (96)	85 (96,6)	1,000
	pM+	6 (3,8)	3 (2,3)		6 (3,6)	4 (4,1)		6 (4)	3 (3,4)	
Scarff-Bloom-Richardson, n (%)	Grau 1	45 (25,1)	32 (21,1)	0,248	42 (23)	26 (22,6)	0,689	36 (21,2)	21 (20,6)	0,405
	Grau 2	95 (53,1)	75 (49,3)		98 (53,6)	57 (49,6)		84 (49,4)	58 (56,9)	
	Grau 3	39 (21,8)	45 (29,6)		43 (23,5)	32 (27,8)		50 (29,4)	23 (22,5)	
Estadiamento Clínico, n (%)	Estágio Precoce	130 (82,3)	104 (77)	0,265	141 (82,5)	76 (76,8)	0,257	127 (81,4)	75 (82,4)	0,843
	Estágio Tardio	28 (17,7)	31 (23)		30 (17,5)	23 (23,2)		29 (18,6)	16 (17,6)	
Grau Nuclear, n (%)	Grau 1	12 (6,7)	8 (5,2)	0,836	12 (6,5)	8 (7)	0,607	7 (4,1)	6 (5,9)	0,791
	Grau 2	65 (36,1)	58 (37,9)		75 (40,5)	40 (34,8)		63 (36,6)	37 (36,3)	
	Grau 3	103 (57,2)	87 (56,9)		98 (53)	67 (58,2)		102 (59,3)	59 (57,8)	

Resposta à	Não	29 (17,1)	28 (18,7)	0,708	41 (22,4)	21 (19,6)	0,578	35 (21,2)	12 (12,2)	0,066
Hormonioterapia, n (%)	Sim	141 (82,9)	122 (81,3)		142 (77,6)	86 (80,4)		130 (78,8)	86 (87,8)	

Valores de p obtidos pelo teste Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher, conforme apropriado.

4.3 Associação da Expressão Gênica dos Membros da Família PHLDA com Características Clínico-patológicas Acessados da Plataforma GEO

Utilizando um conjunto de dados públicos de cDNA *microarray* disponíveis na plataforma GEO (*Gene Expression Omnibus*), realizamos o *download* dos dados do estudo GSE9893 (132 tumores primários de mama ER+ de pacientes que receberam tamoxifeno como terapia adjuvante por 5 anos) quanto informações histopatológicas, clínicas, demográficas e de expressão gênica da família PHLDA para cada paciente presente neste estudo (CHANRION et al., 2008). Posteriormente, exploramos o impacto do status da expressão gênica dos integrantes da família PHLDA, de acordo com os diferentes indicadores clínico-patológicos. Foi identificado que a expressão diferencial de PHLDA1 e PHLDA2 estava relacionada com a resposta à hormonioterapia (*Qui-quadrado* $p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente) (Tabela 5). Adicionalmente, a alta expressão de PHLDA2 esteve fortemente associada com menor comprometimento linfonodal (*Qui-quadrado* $p<0,0001$) (Tabela 5). Não houve associação significativa entre a expressão de PHLDA3 e os parâmetros testados, incluindo idade, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, grau SBR e resposta a terapia endócrina (Tabela 5).

Tabela 5: Associação da expressão gênica dos membros da família PHLDA de acordo com fatores clínico-patológicos e marcadores biomoleculares em tumores luminiais de mama (GSE9893).

Variáveis	Categorias	Expressão mRNA		<i>P value</i>	Expressão mRNA		<i>P value</i>	Expressão mRNA		<i>P value</i>
		PHLDA1			PHLDA2			PHLDA3		
		<i>Low</i>	<i>High</i>		<i>Low</i>	<i>High</i>		<i>Low</i>	<i>High</i>	
Idade, n (%)	<50	1 (1,3)	0 (0)	0,503	0 (0)	1 (1,3)	0,497	0 (0)	1 (1,3)	0,497
	≥50	77 (98,7)	77 (100)		78 (100)	76 (98,7)		78 (100)	76 (98,7)	
Tamanho do Tumor, n (%)	T1 + T2	73 (93,6)	72 (93,5)	0,619	73 (93,6)	72 (93,5)	0,619	75 (96,2)	70 (90,9)	0,158
	T3 + T4	5 (6,4)	5 (6,5)		5 (6,4)	5 (6,5)		3 (3,8)	7 (9,1)	
Comprometimento Linfonodal, n (%)	pN0	35 (46)	43 (58,1)	0,140	26 (34,7)	52 (69,3)	<0,0001	41 (54)	37 (50)	0,629
	pN+	41 (54)	31 (41,9)		49 (65,3)	23 (30,7)		35 (46)	37 (50)	
<i>Scarff-Bloom-Richardson</i> , n (%)	Grau 1	9 (12,1)	12 (16,2)	0,582	7 (9,6)	14 (18,7)	0,196	11 (14,5)	10 (13,9)	0,899
	Grau 2	50 (67,6)	44 (59,5)		51 (69,9)	43 (57,3)		47 (61,8)	47 (65,3)	
	Grau 3	15 (20,3)	18 (24,3)		15 (20,5)	18 (24)		18 (23,7)	15 (20,8)	
Resposta à Hormonioterapia, n (%)	Não	36 (46,2)	16 (20,8)	0,001	36 (46,2)	16 (20,8)	0,001	24 (30,8)	28 (36,4)	0,461
	Sim	42 (53,8)	61 (79,2)		42 (53,8)	61 (79,2)		54 (69,2)	49 (63,6)	

Valores de *p* obtidos pelo teste Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher, conforme apropriado.

Valores de *p* destacados em negrito indicam significância estatística.

4.4 Impacto da Expressão Proteica dos Membros da Família PHLDA na Sobrevida das Pacientes com Câncer de Mama

Neste estudo acessamos o significado prognóstico da expressão dos membros da família PHLDA em pacientes com câncer de mama subtipados em luminais. As curvas de Kaplan-Meier das probabilidades cumulativas de OS e DFS foram realizadas em nossa coorte, independentemente do tratamento e em relação com a resposta à hormonioterapia.

Na população estudada, não encontramos evidências estatísticas de que o status da expressão de PHLDA1 estivesse associado com o prognóstico das pacientes (OS, *log-rank* $p=0,897$; DFS, *log-rank* $p=0,332$) (Figuras 8A e 8B, respectivamente). As evidências amostrais permitiram inferir que não existe associação estatisticamente significativa entre o status da expressão de PHLDA2 com a sobrevida das pacientes (OS, *log-rank* $p=0,095$; DFS, *log-rank* $p=0,221$) (Figuras 9A e 9B, respectivamente). A expressão diferencial de PHLDA3 não foi determinante para classificar os pacientes em melhor ou pior prognóstico (OS, *log-rank* $p=0,138$; DFS, *log-rank* $p=0,216$) (Figuras 10A e 10B, respectivamente).

Como esperado, em nossa coorte, pacientes que não responderam à terapia hormonal apresentaram taxas significativamente reduzidas de OS e DFS (OS, *log-rank* $p<0.0001$; DFS, *log-rank* $p<0.0001$) (Figuras 8C e 8D, 9C e 9D, 10C e 10D). Além disso, as evidências amostrais permitiram inferir que entre os pacientes que não responderam à terapia endócrina e, consequentemente, tiveram baixas taxas de sobrevivência, aquelas com expressão reduzida de PHLDA2 apresentaram piores taxas cumulativas de OS (*log-rank* $p=0,036$), no entanto, não houve correlação com a DFS (*log-rank* $p=0,168$) (Figuras 9C e 9D, respectivamente). A expressão diferencial de PHLDA1 não foi determinante na estratificação do prognóstico entre as pacientes não responsivas à hormonioterapia (OS, *log-rank* $p=0,782$; DFS, *log-rank* $p=0,104$) (Figuras 8C e 8D, respectivamente). A expressão de PHLDA3, também não mostrou associação significativa na sobrevida das pacientes em função da terapia endócrina, mas apenas uma tendência a taxas de sobrevivência menores nas pacientes não responsivas com baixa expressão dessa proteína (OS, *log-rank* $p=0,107$; DFS, *log-rank* $p=0,200$) (Figuras 10C e 10D, respectivamente).

Figura 8: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) de pacientes com câncer de mama luminal estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA1. As curvas de sobrevida global (A, C) e de sobrevida livre de doença (B, D) foram calculadas para cada grupo de pacientes. A e B - Pacientes com tumores de câncer de mama luminal classificados como negativo e positivo para PHLDA1. C e D - Pacientes com tumores de câncer de mama luminal categorizados de acordo com o status da expressão de PHLDA1 e resposta ao tratamento hormonal. Valores de p destacados em negrito indicam significância estatística.

Figura 9: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) de pacientes com câncer de mama luminal estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA2. As curvas de sobrevida global (A, C) e de sobrevida livre de doença (B, D) foram calculadas para cada grupo de pacientes. A e B - Pacientes com tumores de câncer de mama luminal classificados como *high* (alto) e *low* (baixo) para PHLDA2. C e D - Pacientes com tumores de câncer de mama luminal categorizados de acordo com o status da expressão de PHLDA2 e resposta ao tratamento hormonal. Valores de *p* destacados em negrito indicam significância estatística.

Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) de pacientes com câncer de mama luminal estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA3. As curvas de sobrevida global (A, C) e de sobrevida livre de doença (B, D) foram calculadas para cada grupo de pacientes. A e B - Pacientes com tumores de câncer de mama luminal classificado como *high* (alto) e *low* (baixo) para PHLDA3. C e D - Pacientes com tumores de câncer de mama luminal categorizados de acordo com o status da expressão de PHLDA3 e resposta ao tratamento hormonal. Valores de *p* destacados em **negrito** indicam significância estatística.

5. DISCUSSÃO

Embora os grandes avanços no diagnóstico, prognóstico, prevenção e tratamento do câncer de mama, este tipo de tumor maligno continua sendo o mais prevalente e letal em mulheres a nível global (HARBECK et al., 2019). Neste contexto, centenas de outros candidatos a biomarcadores têm sido investigados e estudados para potenciais implicações no diagnóstico, prognóstico e na terapia personalizada. Dessa maneira, nosso estudo teve por objetivo investigar o perfil de expressão dos integrantes da família PHLDA (*Pleckstrin homology-like domain, family A*) e potencial valor prognóstico clinicamente útil no câncer de mama, levando em conta a limitação de estudos sistemáticos anteriores neste contexto e a atraente relação destes três genes que compõem a família em processos pro-apoptóticos e anti-proliferativos. Conduzimos uma avaliação ampla e sistemática para PHLDA1, PHLDA2 e PHLDA3 pela técnica de IHQ em 493 amostras de tumores primários de mama com perfil imunofenotípico luminal, incorporadas em cinco blocos de TMAs, a fim de alcançar uma população de estudo mais homogênea.

Nossa avaliação IHQ revelou que a proteína PHLDA1 foi mais expressa em tumores de mama luminais (54,1%), com localização subcelular predominantemente citoplasmática em células neoplásicas mamárias, havendo pouca ou nenhuma variação de intensidade de imunocoloração. Existem dados limitados quanto à exata distribuição, intensidade e localização desta proteína em diferentes tecidos, contudo, outros trabalhos utilizando protocolos de IHQ em secções de tecidos de carcinoma mamário, constataram que a proteína PHLDA1 apresentava frequente imunorreatividade no citoplasma de células neoplásicas da mama (JOHNSON et al., 2011; LI et al., 2014a; NAGAI et al., 2007).

Nossos achados de IHQ mostraram que a proteína PHLDA2 apresenta-se frequentemente localizada no citoplasma de células neoplásicas da mama, com variação de intensidade de imunomarcção, contudo, a maioria de nossos casos interpretáveis mostrou baixa expressão deste marcador em tumores de mama subtipados como luminais (62%). Relatos anteriores revelaram que a expressão diminuída de PHLDA2 é um evento frequente no osteossarcoma (DAI et al., 2012, 2016; WANG et al., 2016). Corroborando com nossos achados, Valoyes (2018) identificaram que transcritos de PHLDA2 são significativamente menos expressos nos tumores luminais quando comparado com os demais subtipos moleculares de câncer de mama ($p < 0,0001$).

Por fim, para o último membro da família PHLDA, nossa avaliação IHQ revelou que a proteína PHLDA3 foi encontrada quase que exclusivamente em células tumorais de câncer de

mama, com prevalente imunorreatividade nuclear e perinuclear, e menos frequentemente citoplasmática. Dados publicados até o momento indicam que PHLDA3 está localizado primariamente na membrana celular pela sua maior afinidade de ligação aos PIPs através de seu domínio PHL e também pode ser detectado no citoplasma e no núcleo (MUROI et al., 2015; SAKATA et al., 2017; SAXENA et al., 2002; TAKIKAWA; OHKI, 2017). Descobrimos ainda que a baixa expressão da proteína PHLDA3 é um evento frequente nos tumores primários da mama do subtipo luminal (63%). A regulação negativa da expressão de PHLDA3 foi relatada em tumores da próstata e tumores neuroendócrinos do pâncreas em estágio avançado (MAHAPATRA et al., 2012; OHKI et al., 2014; TAKIKAWA; OHKI, 2017).

Em nosso estudo, não encontramos associações estatisticamente significativas entre os níveis de expressão proteica de PHLDA1 e PHLDA2 com nenhum dos parâmetros clínico-patológicos testados. Adicionalmente, utilizamos um conjunto de dados de cDNA *microarray* de 132 tumores primários de mama ER+ de pacientes que foram tratados com tamoxifeno e que estavam disponíveis na plataforma GEO (GSE9893). Exploramos o impacto do status da expressão gênica de PHLDA1 e PHLDA2 nestas amostras de câncer de mama luminal, de acordo com diferentes indicadores clínico-patológicos. Foi identificado que a expressão diferencial destes marcadores estava significativamente correlacionada com a resposta à terapia endócrina. Além disso, para PHLDA2, também foi identificado que o aumento de expressão de mRNA estava fortemente associado ao menor comprometimento de linfonodos. Os linfonodos são unidades funcionais do sistema imunológico, suportando as complexas interações entre as células T, células B, células apresentadoras de antígenos e células estromais (PEINTINGER et al., 2018). Rotineiramente na prática clínica, a presença e a extensão de metástases nos linfonodos, são indicadores do fenótipo agressivo, geralmente com uma relação inversa com o prognóstico (BAKKOUR et al., 2019). Deste modo, o conjunto de genes que preveem consistentemente o desenvolvimento de metástase linfonodal tem sido alvo de muitos estudos. Apreciamos a forte correlação de PHLDA2 em nível de transcrito, mas não de proteína, com o comprometimento de linfonodos, vale ressaltar que esses achados são incipientes, e maiores investigações são necessárias neste contexto.

Finalmente, acessamos o significado prognóstico da expressão proteica de PHLDA1. Nossos resultados mostraram que a expressão diferencial de PHLDA1 não foi determinante na sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) das pacientes. Esses achados contradizem relato anterior obtido usando a técnica de IHQ em uma grande coorte de 699 amostras de tumores primários de mama, no qual, verificou-se que a regulação negativa da proteína PHLDA1 foi um fator prognóstico independente de pior OS ($p < 0,001$) e DFS

($p < 0,001$) (NAGAI et al., 2007). No entanto, temos que ter cautela na confrontação de nossos dados com a literatura, levando em conta o número de pacientes relativamente limitado de nosso estudo e o uso de uma coorte de conveniência, onde analisamos apenas os casos do subtipo luminal, que por si só apresentam um prognóstico mais favorável comparado com os outros subtipos de câncer de mama (HENNIGS et al., 2016), além de que, aproximadamente 70% de nossa coorte constitui-se de tumores de pacientes com estágio clínico precoce e 75,4% foram responsivas a terapia endócrina. Em contrapartida, em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa no qual foram analisados conjuntos de dados de cDNA *microarray* oriundos do TCGA e que foram acessados no banco de dados on-line KM Plotter, revelaram que pacientes com baixos níveis de transcritos para PHLDA1 apresentaram piores taxas cumulativas de DFS nos tumores Luminal A e B, indicando que PHLDA1 pode ser um potencial biomarcador preditivo para o prognóstico no câncer de mama luminal (VALOYES, 2018). Estas discrepâncias entre os achados de proteínas e transcritos de PHLDA1 podem ser atribuíveis à natureza de nossa coorte, complicados mecanismos de transcrição e tradução, alterações na meia-vida e atrasos na síntese de proteínas (LIU; BEYER; AEBERSOLD, 2016). Muitas evidências experimentais tem demonstrado que a expressão de PHLDA1 está envolvida em caminhos apoptóticos intrínsecos e extrínsecos (GOMES et al., 1999; LIU et al., 2011; WANG et al., 2018a), na indução de processos autofágicos (DURBAS et al., 2016; MOAD et al., 2013) e com funções antiproliferativas (BONATTO et al., 2017; CHEN et al., 2018; EINBOND et al., 2012; LI et al., 2014a) principalmente, mas não exclusivamente, pelo bloqueio da atividade de AKT. Outros trabalhos de diferentes pesquisadores já haviam verificado o potencial papel supressor tumoral de PHLDA1 no câncer de mama (BONATTO et al., 2017; CHEN et al., 2018; FEARON et al., 2018; NAGAI et al., 2007; VALOYES, 2018).

As curvas de Kaplan Meier e as análises de *log-rank* indicaram que o status da expressão proteica de PHLDA2 não esteve correlacionado com a sobrevida das pacientes. Adicionalmente, a avaliação de dados transcriptômicos para PHLDA2 acessados da plataforma KM Plotter, revelaram que pacientes com aumento de expressão de mRNA de PHLDA2 apresentam um pior prognóstico clínico nos tumores luminais (VALOYES, 2018). Até onde sabemos o padrão de expressão proteica de PHLDA2 no câncer de mama não havia sido anteriormente investigado. O gene PHLDA2 diferentemente de seus parálogos da família PHLDA, exibe expressão monoalélica com expressão preferencial do alelo materno, descrito como o primeiro gene pro-apoptótico regulado por *imprinting* genômico (FRANK et al., 1999; LEE; FEINBERG, 1998). Muitos estudos tem mostrado a implicação da expressão de PHLDA2 para indução de apoptose (DAI et al., 2012; JIN et al., 2016; LI et al., 2014b) e como regulador

da progressão do ciclo celular (JIN et al., 2015, 2016). Alterações no padrão de expressão desta proteína já foram relatadas na promoção da EMT (LV et al., 2016). Adicionalmente, foi demonstrado que a interação intracelular estrutural entre PHLDA2/RanBP9 funcionam como complexo proteico para repressão da via Src/AKT (DAI et al., 2016), indução de autofagia (ZHAO et al., 2018), ativação de *anoikis* (DAI et al., 2016) e supressão da auto-renovação de células-tronco (YAN et al., 2017). Contudo, contradições entre o nível de expressão de PHLDA2 e papel na tumorigênese têm sido descritas, incluindo a perda de expressão deste marcador em adenocarcinoma pulmonar (WANG et al., 2018b) e osteossarcoma (HUANG; DAI; GUO, 2012; LV et al., 2015; WANG et al., 2016). Além disso, já foi relatado como potencial oncogene em câncer de mama (MOON et al., 2015; VALOYES, 2018), adenocarcinoma pulmonar (HSU et al., 2017) e no carcinoma pancreático (IDICHI et al., 2018).

Por fim, para o último membro da família PHLDA, não observamos correlação significativa entre o status de expressão da proteína PHLDA3 com nenhum de nossos parâmetros testados, exceto uma ligeira associação com a resposta à terapia hormonal. Complementarmente, na análise com dados públicos *Affymetrix* (GSE9893) obtidos no banco de dados GEO, as evidências amostrais permitiram inferir que não houve correlação entre a expressão diferencial de transcritos para PHLDA3 com nenhuma variável colocada à prova. Além disso, nossas análises de sobrevida mostraram que o status da expressão proteica de PHLDA3 não foi um fator prognóstico para OS e DFS. Em contra partida, relato anterior utilizando dados transcriptômicos acessados da plataforma on-line KM Plotter, mostraram que a redução da expressão gênica de PHLDA3 esteve fortemente correlacionada com pior DFS tanto no subtipo Luminal A, quanto no Luminal B, indicando que a expressão de PHLDA3 seja um fator prognóstico para melhores taxas cumulativas de sobrevida livre de recorrência no câncer de mama luminal (VALOYES, 2018). Atualmente, poucas evidências experimentais foram realizadas quanto ao perfil de expressão e potencial valor prognóstico de PHLDA3 em diferentes modelos tumorais, incluindo o câncer de mama. O gene PHLDA3 tem sido reportado como potencial candidato a supressor tumoral, postulado que é um dos diversos genes transativados pela molécula p53, imprescindível para indução da parada de crescimento e morte celular, reparo no DNA e senescência (KAWASE et al., 2009; MULLER; VOUSDEN, 2013). Além disso, PHLDA3 tem sido relatado como um importante repressor da atividade de AKT pela ligação competitiva aos PIPs na membrana plasmática, inibindo vias de proliferação e sobrevivência celular (KAWASE et al., 2009; QIAO et al., 2017). Muitos estudos tem descrito PHLDA3 como um importante gene para funções supressoras tumorais em adenocarcinoma pulmonar (KAWASE et al., 2009; LESZCZYNSKA et al., 2015), câncer de próstata

(MAHAPATRA et al., 2012; OHKI et al., 2014), carcinoma colorretal (KAWASE et al., 2009; LESZCZYNSKA et al., 2015; OHKI et al., 2014) e câncer de mama (CHRISTGEN et al., 2012; PAPPAS et al., 2017).

A terapia endócrina é considerada o tratamento padrão para pacientes com tumores sensíveis ao estrogênio (ER+), no entanto, um grande obstáculo são os mecanismos de resistência a múltiplas drogas, que acabam aumentando significativamente as taxas de recaída e mortalidade (CALAF et al., 2015). Os mecanismos moleculares envolvidos na resistência à hormonioterapia são extremamente complexos e envolvem diversas proteínas, mediadores solúveis e fatores de transcrição, além do sistema imunológico e de células-tronco tumorais, que terminam por induzir inúmeras cascatas de eventos cruciais para tornar células de câncer de mama resistentes ao sistema endócrino (RANI et al., 2019). Dentre os diversos mecanismos de resistência a hormonioterapia é possível destacar: perda de expressão ou mutação em ER α , deficiência de PR, ativação de receptores de tirosina quinase, super-expressão de reguladores do ciclo celular e de fatores induzidos por hipóxia, alteração do metabolismo da droga e mais recentemente, miRNAs e vesículas extracelulares derivadas de células tumorais (RANI et al., 2019). Adicionalmente, a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR tem sido consistentemente implicada na resistência à terapia endócrina (BURRIS, 2013; RANI et al., 2019). Neste contexto, considerando que proteínas com o domínio PHL podem se ligar aos PIPs na superfície da membrana intracelular para supressão da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e que a ativação desta via pode estar envolvida na resistência a terapia endócrina, investigamos o papel potencial da expressão dos integrantes da família PHLDA como preditor da resposta à terapia hormonal adjuvante. Nossos resultados demonstraram que entre os pacientes não responsivos ao tratamento endócrino, aquelas com expressão proteica reduzida de PHLDA2 apresentaram notavelmente piores taxas cumulativas de OS, no entanto, não houve correlação com a DFS. Além disso, nos casos de tumores de pacientes resistentes à hormonioterapia que apresentavam baixos níveis de expressão para PHLDA3, as taxas de sobrevivência tendiam a serem inferiores por um determinado tempo de seguimento, embora isso não fosse estatisticamente significativo. Levando isso em consideração, hipotetizamos que PHLDA3 e principalmente PHLDA2, possa estar competindo com AKT pelas ligações de PIPs na membrana celular, reduzindo a fosforilação e a ativação desta oncoproteína, diminuindo assim as taxas de proliferação e sobrevivência das células tumorais da mama e afetando a sobrevivência e a resposta endócrina dos pacientes.

Em resumo, este trabalho explorou o potencial valor prognóstico e preditivo de resposta à terapia hormonal adjuvante dos integrantes da família PHLDA em pacientes com câncer de

mama do subtipo luminal. A avaliação IHQ revelou que a expressão reduzida de PHLDA1, PHLDA2 e PHLDA3 é um evento frequente em tumores de mama luminais. A expressão dos integrantes da família PHLDA não foi associada a nenhuma característica clínico-patológica, mas mostrou uma associação com a resposta à terapia hormonal, tanto nos dados de proteína quanto de transcrito. Apesar das limitações de nosso estudo pelo uso de uma coorte de conveniência e número relativamente limitado de pacientes, nossos dados mostram pela primeira vez uma associação entre a expressão reduzida dos membros da família PHLDA e resposta à hormonioterapia em pacientes com câncer de mama do subtipo luminal.

6. CONCLUSÃO

Embora preliminares, nossos achados sugerem um potencial valor preditivo para resposta à terapia endócrina em pacientes com câncer de mama com tumores do subtipo luminal com altos níveis de expressão para PHLDA1, PHLDA2 e PHLDA3, ainda que não fosse estatisticamente significativo. O desenvolvimento deste trabalho pode fornecer informações valiosas sobre o papel dos membros da família PHLDA na tumorigênese da mama e o impacto na sobrevida e resposta à hormonioterapia. Mais estudos clínicos e experimentais são necessários para entender melhor a relação entre a expressão dos integrantes da família PHLDA e o processo tumorigênico da mama e seu valor prognóstico e preditivo no câncer de mama.

7. REFERÊNCIAS

- ADEGBUYIRO, A. et al. Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. **Biochemistry**, v. 56, n. 9, p. 1199–1217, 2017.
- AGRAWAL, S. N.; DHURUV, K.; MESHRAM, S. p53: The Guardian of Genome, Apoptosis, and its role in Carcinogenesis. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 161–166, 2017.
- AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 1–23, 2017.
- AMUNDSON, S. A et al. Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. **Molecular cancer research: MCR**, v. 1, n. 6, p. 445–452, 2003.
- ANDRADE, K. C. et al. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p.R337H mutation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 199–202, 2016.
- ANDRADE, R. C. et al. TP53 and CDKN1A mutation analysis in families with Li–Fraumeni and Li–Fraumeni like syndromes. **Familial Cancer**, v. 16, n. 2, p. 243–248, 2017.
- ANGAHAR, L. T. An Overview of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Pathophysiology, and Cancer Risks Reduction. **MOJ Biology and Medicine**, v. 1, n. 4, p. 92–96, 2017.
- ANJUM, F. et al. A review of breast cancer risk factors. **Universal Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 5, p. 40–45, 2017.
- APOSTOLIDIS, P. A. et al. Proposed megakaryocytic regulon of p53: The genes engaged to control cell cycle and apoptosis during megakaryocytic differentiation. **Physiological Genomics**, v. 44, n. 12, p. 638–650, 2012.
- BAGNARDI, V. et al. Light alcohol drinking and cancer: A meta-analysis. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 2, p. 301–308, 2013.
- BAJRAMI, E.; SPIROSKI, M. Genomic Imprinting. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 181–184, 2016.
- BAKKOUR, A. M. et al. The predictors and the prognostic significance of axillary lymph nodes involvement in breast cancer. **International Surgery Journal**, v. 6, n. 5, p. 1–5, 2019.
- BAN, K. A.; GODELLAS, C. V. Epidemiology of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 409–422, 2014.
- BANKHEAD, P. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.

- BAUER, S. R. et al. Plasma vitamin d levels, menopause, and risk of breast cancer: Dose-response meta-analysis of prospective studies. **Medicine (United States)**, v. 92, n. 3, p. 123–131, 2013.
- BELLANGER, M. et al. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? **Journal of Global Oncology**, v. 1, n. 4, p. 1–16, 2018.
- BENSELLAM, M. et al. Phlda3 regulates beta cell survival during stress. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- BERAL, V. et al. Breast cancer and breastfeeding: Collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50.302 women with breast cancer and 96.973 women without the disease. **Lancet**, v. 360, n. 9, p. 187–195, 2002.
- BERNARD, P. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 2009.
- BOMBONATI, A.; SGROI, D. The Molecular Pathology of Breast Cancer Progression Alessandro. **Journal of Pathology**, v. 223, n. 2, p. 307–317, 2011.
- BONATTO, N. et al. PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain , family A , member 1) knockdown promotes migration and invasion of MCF10A breast epithelial cells. **Cell Adhesion & Migration**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2017.
- BOUSQUENAUD, M. et al. Obesity promotes the expansion of metastasis-initiating cells in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BUDNY, A. et al. Obesity as a tumour development triggering factor. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 1, p. 13–23, 2019.
- BURRIS, H. A. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: Focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 829–842, 2013.
- BURSTEIN, M. D. et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1688–1698, 2015.
- CALAF, G. M. et al. Molecular aspects of breast cancer resistance to drugs (Review). **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 2, p. 437–445, 2015.
- CAO, B. et al. Benchmarking life expectancy and cancer mortality: Global comparison with

- cardiovascular disease 1981-2010. **BMJ (Online)**, v. 357, n. 6, p. 1–11, 2017.
- CARLISLE, R. E. et al. TDAG51 mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular epithelium. **AJP: Renal Physiology**, v. 303, n. 3, p. F467–F481, 2012.
- CARROLL, J. S. et al. Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017.
- CARVALHO, F. M. et al. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. **BMC Women's Health**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.
- CHANRION, M. et al. A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. 1744–1752, 2008.
- CHEN, Y. et al. PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt. **Cancer Science**, v. 109, n. 11, p. 3532–3542, 2018.
- CHIU, S.-T. et al. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 2, p. 437–443, 2005.
- CHO, N. Molecular subtype and imaging phenotype of breast cancer. **Ultrasonography**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2016.
- CHRISTGEN, M. et al. IPH-926 lobular breast cancer cells harbor a p53 mutant with temperature-sensitive functional activity and allow for profiling of p53-responsive genes. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 11, p. 1635–1647, 2012.
- CIRIELLO, G. et al. The molecular diversity of Luminal A breast tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 141, n. 3, p. 409–420, 2013.
- COUTINHO-CAMILLO, C. M. et al. Expression of PAR-4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 463, n. 1, p. 31–39, 2013.
- CREIGHTON, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 289–297, 2012.
- DAI, H. et al. TSSC3 overexpression associates with growth inhibition, apoptosis induction and enhances chemotherapeutic effects in human osteosarcoma. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 30–40, 2012.
- DAI, H. et al. RanBP9/TSSC3 complex cooperates to suppress anoikis resistance and metastasis via inhibiting Src-mediated Akt signaling in osteosarcoma. **Cell death & disease**, v. 7, n. 12, p. 1–12, 2016.
- DAY, F. R. et al. Large-scale genomic analyses link reproductive aging to hypothalamic

- signaling, breast cancer susceptibility and BRCA1-mediated DNA repair. **Nature Genetics**, v. 47, n. 11, p. 1294–1303, 2015.
- DAY, F. R. et al. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. **Nature Genetics**, v. 49, n. 6, p. 834–841, 2017.
- DAY, K. R.; JAGADEESWARAN, P. Microarray analysis of prothrombin knockdown in zebrafish. **Blood Cells Mol Dis**, v. 43, n. 2, p. 202–210, 2009.
- DURBAS, M. et al. Downregulation of the PHLDA1 gene in IMR-32 neuroblastoma cells increases levels of Aurora A, TRKB and affects proteins involved in apoptosis and autophagy pathways. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 2, p. 823–837, 2016.
- DURBAS, M. et al. GD2 ganglioside-binding antibody 14G2a and specific aurora A kinase inhibitor MK-5108 induce autophagy in IMR-32 neuroblastoma cells. **Apoptosis**, v. 23, n. 9, p. 492–511, 2018.
- EICHNER, J. et al. Evaluation of toxicogenomics approaches for assessing the risk of nongenotoxic carcinogenicity in rat liver. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–15, 2014.
- EINBOND, L. S. et al. Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. **Fitoterapia**, v. 83, n. 7, p. 1160–1168, 2012.
- ELLSWORTH, R. E. et al. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 64, n. 1, p. 65–72, 2017.
- EVANGELISTA, M. T. P.; NORTH, J. P. Comparative analysis of cytokeratin 15, TDAG51, cytokeratin 20 and androgen receptor in sclerosing adnexal neoplasms and variants of basal cell carcinoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 42, n. 11, p. 824–831, 2015.
- FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397–406, 2014.
- FEARON, A. E. et al. PHLDA1 Mediates Drug Resistance in Receptor Tyrosine Kinase-Driven Cancer. **Cell Reports**, v. 22, n. 9, p. 2469–2481, 2018.
- FENG, J. et al. Modeling of PH Domains and Phosphoinositides Interactions and Beyond. **Adv Exp Med Biol - Protein**, v. 1, n. 1–14, 2018a.
- FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018b.
- FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN

- sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.
- FERREIRA, M. P.; NAGAI, M. A. PHLDA3 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 3). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 24, n. 1, p. 8–12, 2020.
- FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018.
- FRANK, D. et al. A novel pleckstrin homology-related gene family defined by *lpl/Tssc3*, *TDAG51*, and *Tih1*: Tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting. **Mammalian Genome**, v. 10, n. 12, p. 1150–1159, 1999.
- FRANK, D. et al. Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene *Ipl*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7490–7495, 2002.
- FURIHATA, C. et al. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 834, n. 2, p. 51–55, 2018.
- GAO, J. J.; SWAIN, S. M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. **The Oncologist**, v. 23, n. 5, p. 556–565, 2018.
- GARCÍA FERNÁNDEZ, A. et al. Mortality and recurrence patterns of breast cancer patients diagnosed under a screening programme versus comparable non-screened breast cancer patients from the same population: Analytical survey from 2002 to 2012. **Tumor Biology**, v. 35, n. 3, p. 1945–1953, 2014.
- GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.
- GOMES, I. et al. A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 2, p. 612–622, 1999.
- GUERRERO, V. G. et al. Monitoring modifiable risk factors for breast cancer: An obligation for health professionals. **Pan American Journal of Public Health**, v. 41, n. 12, p. 1–6, 2017.
- HAFETY, B. G. et al. Locoregional Relapse and Distant Metastasis in Conservatively Managed Triple Negative Early-Stage Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5652–5657, 2006.
- HAMMOND, E. M.; DORIE, M. J.; GIACCIA, A. J. ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 12207–12213, 2003.

- HAN, C. Y. et al. PHLDA3 overexpression in hepatocytes by endoplasmic reticulum stress via IRE1-Xbp1s pathway expedites liver injury. **Gut**, v. 65, n. 8, p. 1377–1388, 2016.
- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646–674, 2011.
- HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1–31, 2019.
- HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 1, p. 1134–1150, 2017.
- HARTMANN, L. C. et al. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 3, p. 229–237, 2005.
- HAYASHIDA, N. et al. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. **EMBO Journal**, v. 25, n. 20, p. 4773–4783, 2006.
- HENNIGS, A. et al. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.
- HENRY, N. L.; CANNON-ALBRIGHT, L. Breast Cancer Histologic Subtypes Show Excess Familial Clustering. **Wiley Cancer**, v. 1, n. 1, p. 3131–3138, 2019.
- HIBI, D. et al. Molecular mechanisms underlying ochratoxin a-induced genotoxicity: Global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n. 1, p. 57–69, 2013.
- HINZ, T. et al. Inhibition of protein synthesis by the T cell receptor-inducible human TDAG51 gene product. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 5, p. 345–352, 2001.
- HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013.
- HOSSAIN, G. S. et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 30317–30327, 2003.
- HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: An overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 2014.
- HOWELL, A. et al. Risk determination and prevention of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 1–19, 2014.
- HSU, Y.-L. et al. Identification of novel gene expression signature in lung adenocarcinoma by using next-generation sequencing data and bioinformatics analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 104831–104854, 2017.
- HU, R. J. et al. A 2.5-Mb transcript map of a tumor-suppressing subchromosomal transferable

fragment from 11p15.5, isolation and sequence analysis of three novel genes. **Genomics**, v. 46, n. 1, p. 9–17, 1997.

HUANG, Y.; DAI, H.; GUO, Q. N. TSSC3 overexpression reduces stemness and induces apoptosis of osteosarcoma tumor-initiating cells. **Apoptosis**, v. 17, n. 8, p. 749–761, 2012.

HUNTER, D. J. et al. Oral contraceptive use and breast cancer: A prospective study of young women. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 19, n. 10, p. 2496–2502, 2010.

IDICHI, T. et al. Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: Impact of passenger strand of pre-miR-148a on gene regulation. **Cancer Science**, v. 109, n. 6, p. 2013–2026, 2018.

JANUS, P. et al. PHLDA1 does not contribute directly to heat shock-induced apoptosis of spermatocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2020.

JIANG, Z. et al. Computational analysis of the binding specificities of PH domains. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1–12, 2015.

JIN, F. et al. The expression of the imprinted gene pleckstrin homology-like domain family A member 2 in placental tissues of preeclampsia and its effects on the proliferation, migration and invasion of trophoblast cells JEG-3. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 11, p. 1142–1151, 2015.

JIN, F. et al. Lentivirus-mediated PHLDA2 overexpression inhibits trophoblast proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 4, p. 949–957, 2016.

JOHNSON, E. O. et al. PHLDA1 is a crucial negative regulator and effector of Aurora A kinase in breast cancer. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 16, p. 2711–2722, 2011.

JOO, J. H. et al. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. **Cancer research**, v. 67, n. 16, p. 7929–7936, 2007.

KAMIŃSKA, M. et al. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015.

KASTRATI, I.; CANESTRARI, E.; FRASOR, J. PHLDA1 Expression is Controlled by an Estrogen Receptor (ER)- NFκB-miR-181 Regulatory Loop and is Essential for Formation of ER+ Mammospheres. **Oncogene**, v. 34, n. 18, p. 2309–2316, 2015.

KAWAI, M. et al. Active smoking and risk of estrogen receptor positive and triplenegative breast cancer among women 20–44 years of age. **Cancer**, v. 120, n. 7, p. 1026–1034, 2014.

KAWASE, T. et al. PH Domain-Only Protein PHLDA3 Is a p53-Regulated Repressor of Akt. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 535–550, 2009.

KERLEY-HAMILTON, J. S. et al. A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in

- testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. **Oncogene**, v. 24, n. 40, p. 6090–6100, 2005.
- KIM, H. S. et al. Hypoxia Regulates the Expression of PHLDA2 in Primary Term Human Trophoblasts. **Placenta**, v. 28, n. 2, p. 77–84, 2007.
- KLEIBL, Z.; KRISTENSEN, V. N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. **The Breast**, v. 28, n. 1, p. 136–144, 2016.
- KOLAK, A. et al. Primary and secondary prevention of breast cancer. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 4, p. 549–553, 2017.
- KOTSOPOULOS, J. BRCA mutations and breast cancer prevention. **Cancers**, v. 10, n. 12, p. 1–15, 2018.
- KRISHNAMURTI, U.; SILVERMAN, J. F. HER2 in Breast Cancer: A Review and Update. **Advances in Anatomic Pathology Anato**, v. 21, n. 2, p. 100–107, 2014.
- KUCHENBAECKER, K. B. et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 317, n. 23, p. 2402–2416, 2017.
- KUMAR, P.; AGGARWAL, R. An overview of triple-negative breast cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 293, n. 2, p. 247–269, 2016.
- KUSKE, M. D.; JOHNSON, J. P. Assignment of the human PHLDA1 gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 89, n. 1, p. 1, 2000.
- LABBADIA, J.; MORIMOTO, R. I. Huntington's disease: Underlying molecular mechanisms and emerging concepts. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 8, p. 378–385, 2013.
- LAMB, C. A. et al. Biological and clinical impact of imbalanced progesterone receptor isoform ratios in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 25, n. 12, p. 605–624, 2018.
- LARSEN, M. J. et al. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 8, n. 1, p. 145–155, 2014.
- LEBLEBICI, C. et al. CD10, TDAG51, CK20, AR, INSM1, and Nestin Expression in the Differential Diagnosis of Trichoblastoma and Basal Cell Carcinoma. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 19–27, 2019.
- LEE, C. G. et al. Phlda3, a urine-detectable protein, causes p53 accumulation in renal tubular cells injured by cisplatin. **Cell Biology and Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 121–130, 2015.
- LEE, M. P.; FEINBERG, A. P. Genomic imprinting of a human apoptosis gene homologue, TSSC3. **Cancer Research**, v. 58, n. 5, p. 1052–1056, 1998.
- LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and

- preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 2011.
- LEHMANN, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes : Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 2016.
- LEMMON, M. A. Pleckstrin homology domains: Not just for phosphoinositides. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, n. 5, p. 707–711, 2004.
- LEMMON, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 99–111, 2008.
- LEMMON, M. A.; FERGUSON, K. M. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. **Biochemical Journal**, v. 350, n. 1, p. 1–18, 2000.
- LEMMON, M. A. Domains and Phosphoinositides. **The Biochemical Society**, v. 93, n. 74, p. 81–93, 2007.
- LESZCZYNSKA, K. B. et al. Hypoxia-induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity via AKT. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 6, p. 2385–2398, 2015.
- LI, G. et al. Modulation of ErbB2 blockade in ErbB2-positive cancers: The role of ErbB2 mutations and PHLDA1. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–13, 2014a.
- LI, Y. et al. Epigenetic regulation of the pro-apoptosis gene TSSC3 in human osteosarcoma cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 1, p. 45–50, 2014b.
- LI, Y. et al. Upregulation of miR-214 induced radioresistance of osteosarcoma by targeting phLDA2 via PI3K/AKT signaling. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2019.
- LI, Y.; MENG, G.; GUO, Q. NAN. Changes in genomic imprinting and gene expression associated with transformation in a model of human osteosarcoma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 84, n. 3, p. 234–239, 2008.
- LIU, F. et al. Expression of Hsf1, Hsf2, and Phlda1 in cells undergoing cryptorchid-induced apoptosis in rat testes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 4, p. 283–291, 2011.
- LIU, L. et al. The long non-coding RNA SNHG1 promotes glioma progression by competitively binding to miR-194 to regulate PHLDA1 expression. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2019.
- LIU, Y.; BEYER, A.; AEBERSOLD, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 535–550, 2016.
- LUKONG, K. E. Understanding breast cancer – The long and winding road. **BBA Clinical**, v. 7, n. 1, p. 64–77, 2017.
- LV, Y. F. et al. Enhancer of zeste homolog 2 silencing inhibits tumor growth and lung

- metastasis in osteosarcoma. **Scientific Reports**, v. 5, n. 8, p. 1–15, 2015.
- LV, Y. FAN et al. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3 β / β -catenin/Snail signaling pathway. **Cancer Letters**, v. 373, n. 2, p. 164–173, 2016.
- LYU, J. H. et al. Regulation of PHLDA1 Expression by JAK2-ERK1/2-STAT3 Signaling Pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 483–490, 2016.
- MAGI, S. et al. Transcriptionally inducible pleckstrin homology-like domain, family a, member 1, attenuates ERBB receptor activity by inhibiting receptor oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 6, p. 2206–2218, 2018.
- MAHAPATRA, S. et al. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 10, p. 2882–2895, 2012.
- MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, n. 1, p. 23–31, 2015.
- MANLEY, S. et al. Relational Database Structure to Manage High-Density Tissue Microarray Data and Images for Pathology Studies Focusing on Clinical Outcome. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 3, p. 837–843, 2001.
- MARCHIORI, A. C.; CASOLARI, D. A.; NAGAI, M. A. Transcriptional up-regulation of PHLDA1 by 17 β -estradiol in MCF-7 breast cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 7, p. 579–582, 2008.
- MASOOD, S. Breast Cancer Subtypes: Morphologic and Biologic Characterization. **Women's Health**, v. 12, n. 1, p. 103–119, 2016.
- MATTES, K. et al. CITED2 affects leukemic cell survival by interfering with p53 activation. **Cell death & disease**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2017.
- MCKEOWN, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - Implications for treatment response. **British Journal of Radiology**, v. 87, n. 1, p. 1–12, 2014.
- MEISNER, A. L. W.; HOUMAN FEKRAZAD, M.; ROYCE, M. E. Breast Disease: Benign and Malignant. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 5, p. 1115–1141, 2008.
- MELVIN, J. C. et al. Family history of breast cancer and its association with disease severity and mortality. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 5, p. 942–949, 2016.
- MOAD, A. I. H. et al. Rapamycin Induces Apoptosis When Autophagy is Inhibited in T-47D Mammary Cells and Both Processes are Regulated by Phlda1. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 66, n. 3, p. 567–587, 2013.
- MONK, D. et al. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 4, p. 235–248, 2019.

- MOON, H. G. et al. Prognostic and functional importance of the engraftment-associated genes in the patient-derived xenograft models of triple-negative breast cancers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 1, p. 13–22, 2015.
- MØRCH, L. S. et al. Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 23, p. 2228–2239, 2017.
- MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2013.
- MULLER, S. et al. Retention of imprinting of the human apoptosis-related gene TSSC3 in human brain tumors. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 5, p. 757–763, 2000.
- MURATA, T. et al. Differential susceptibility to hydrogen sulfide-induced apoptosis between PHLDA1-overexpressing oral cancer cell lines and oral keratinocytes: Role of PHLDA1 as an apoptosis suppressor. **Experimental Cell Research**, v. 320, n. 2, p. 247–257, 2014.
- MUROI, H. et al. Low PHLDA3 Expression in Oesophageal Squamous Cell Carcinomas Is Associated with Poor Prognosis. **Anticancer Research**, v. 35, n. 2, p. 949–954, 2015.
- NAGAI, M. PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 1). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 2, n. 9, p. 652–654, 2014.
- NAGAI, M. A. et al. Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. **International journal of oncology**, v. 23, n. 5, p. 1425–1430, 2003.
- NAGAI, M. A. et al. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 106, n. 1, p. 49–56, 2007.
- NAGAI, M. A. Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 3, p. 275–281, 2016.
- NAROD, S. A. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 11, p. 669–676, 2011.
- NEEF, R. et al. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: Down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. **Cancer Research**, v. 62, n. 20, p. 5920–5929, 2002.
- NORTON, A. J.; JORDAN, S.; YEOMANS, P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. **The Journal of Pathology**, v. 173, n. 4, p. 371–379, 1994.
- NOUNOU, M. I. et al. Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 17–34, 2015.
- OBERG, H.-H. et al. Regulation of T-cell death-associated gene 51 (TDAG51) expression in

- human T-cells. **Cell death and differentiation**, v. 11, n. 6, p. 674–84, 2004.
- OBERST, M. D. et al. TDAG51 is an ERK signaling target that opposes ERK-mediated HME16C mammary epithelial cell transformation. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2008.
- OHKI, R. et al. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 23, p. 2404–2413, 2014.
- OHYAMA, M. et al. Characterization and isolation of stem cell– enriched human hair follicle bulge cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 249–260, 2006.
- OTTINI, L. et al. Male breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 73, n. 2, p. 141–155, 2010.
- PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 1, p. 2817–2826, 2004.
- PAPPAS, K. et al. p53 Maintains Baseline Expression of Multiple Tumor Suppressor Genes. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 1051–1062, 2017.
- PARIKH, C. et al. Disruption of PH – kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. **PNAS**, v. 109, n. 47, p. 19368–19373, 2012.
- PARK, C. G. et al. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. **Immunity**, v. 4, n. 6, p. 583–591, 1996.
- PARK, E.-S. et al. TDAG51 deficiency promotes oxidative stress-induced apoptosis through the generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 8, p. e35, 2013.
- PEINTINGER, F. et al. Lymph Nodes in Breast Cancer - What Can We Learn from Translational Research? **Breast Care**, v. 13, n. 5, p. 342–347, 2018.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 533, n. 5, p. 747–752, 2000.
- POLYAK, K. Science in medicine Breast cancer: origins and evolution. **Cell**, v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007.
- PRAGER, G. W. et al. Global cancer control: Responding to the growing burden, rising costs and inequalities in access. **ESMO Open**, v. 3, n. 2, p. 1–10, 2018.
- PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5–23, 2011.
- QIAN, N. et al. The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 12, p. 2021–2029, 1997.
- QIAO, M. et al. PHLDA3 impedes somatic cell reprogramming by activating Akt-GSK3 β

- pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- RANI, A. et al. Endocrine resistance in hormone receptor positive breast cancer—from mechanism to therapy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. MAY, 2019.
- REN, L. et al. Characterization of the metastatic phenotype of a panel of established osteosarcoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 29469–29481, 2015.
- RHO, J. et al. TDAG51 is not essential for Fas/CD95 regulation and apoptosis in vivo. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 24, p. 8365–8370, 2001.
- RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1113–1124, 2013.
- ROCCA, A. et al. Efficacy of endocrine therapy in relation to progesterone receptor and Ki67 expression in advanced breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 152, n. 1, p. 57–65, 2015.
- ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68–78, 2012.
- RUSSNES, H. G. et al. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 2017.
- RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 3, p. 221–233, 2011.
- SABATIER, R. et al. Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2014.
- SAKATA, N. et al. Pleckstrin homology-like domain family A, member 3 (PHLDA3) deficiency improves islets engraftment through the suppression of hypoxic damage. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–16, 2017.
- SAKTHIANANDESWAREN, A. et al. PHLDA1 expression marks the putative epithelial stem cells and contributes to intestinal tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 71, n. 10, p. 3709–3719, 2011.
- SAUERBREI, W. et al. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An abridged explanation and elaboration. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 110, n. 8, p. 803–811, 2018.
- SAXENA, A. et al. Phosphoinositide binding by the pleckstrin homology domains of Ip1 and Tih1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49935–49944, 2002.
- SCHEFFZEK, K.; WELTI, S. Pleckstrin homology (PH) like domains - Versatile modules in protein-protein interaction platforms. **FEBS Letters**, v. 586, n. 17, p. 2662–2673, 2012.

- SCHLITZ, A. O. C. et al. **Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].
- SCHWIENBACHER, C. et al. Abnormal RNA expression of 11p15 imprinted genes and kidney developmental genes in Wilms' tumor. **Cancer Research**, v. 60, n. 6, p. 1521–1525, 2000.
- SELLHEYER, K. et al. Basaloid tumors in nevus sebaceus revisited: The follicular stem cell marker PHLDA1 (TDAG51) indicates that most are basal cell carcinomas and not trichoblastomas. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 40, n. 5, p. 455–462, 2013.
- SELLHEYER, K.; KRAHL, D. PHLDA1 (TDAG51) is a follicular stem cell marker and differentiates between morphoeic basal cell carcinoma and desmoplastic trichoepithelioma. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 1, p. 141–147, 2011.
- SHAO, J.; DIAMOND, M. I. Polyglutamine diseases: Emerging concepts in pathogenesis and therapy. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 2, p. 115–123, 2007.
- SHARIATI, M.; MERIC-BERNSTAM, F. Targeting AKT for cancer therapy Maryam. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 1, p. 1–31, 2019.
- SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291–1299, 2015.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.
- SIMPSON, P. T. et al. Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. **Journal of Pathology**, v. 215, n. 4, p. 231–244, 2008.
- SKIBINSKI, A.; KUPERWASSER, C. The origin of breast tumor heterogeneity. **Oncogene**, v. 34, n. 42, p. 5309–5316, 2015.
- SONG, Q.; MERAJVER, S. D.; LI, J. Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. **Human Genomics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2015.
- SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.
- SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.
- SPEIRS, V.; SHAABAN, A. M. The rising incidence of male breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115, n. 1, p. 429–430, 2009.
- STAHELIN, R. V.; SCOTT, J. L.; FRICK, C. T. Cellular and molecular interactions of

phosphoinositides and peripheral proteins. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 182, n. 3, p. 3–18, 2014.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. [s.l: s.n.].

SUENAGA, K. et al. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 751, n. 1, p. 73–83, 2013.

SUN, Y. S. et al. Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.

SUNAMURA, N. et al. Regulation of functional KCNQ1OT1 lncRNA by β -catenin. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.

TAKIKAWA, M.; OHKI, R. A vicious partnership between AKT and PHLDA3 to facilitate neuroendocrine tumors. **Cancer Science**, v. 108, n. 6, p. 1101–1108, 2017.

TANG, K. F. et al. Upregulation of PHLDA2 in Dicer knockdown HEK293 cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 5, p. 820–825, 2007.

TORRE, L. A. et al. Global cancer in women: Burden and trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 26, n. 4, p. 444–457, 2017.

TOYOSHIMA, Y. et al. TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25898–25904, 2004.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 1–9, 2020.

TSOUTSOU, P. G. et al. How could breast cancer molecular features contribute to locoregional treatment decision making? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 110, n. 1, p. 43–48, 2017.

TURASHVILI, G.; BROGI, E. Tumor heterogeneity in breast cancer. **Frontiers in Medicine**, v. 227, n. 12, p. 1–11, 2017.

VALOYES, M. A. V. Avaliação do papel funcional e do potencial valor prognóstico dos membros da família PHLDA (Pleckstrin homology-like domain A) utilizando data mining. 2018. 110 f. Dissertação de Mestrado (Oncologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), 2018.

VIJVER, V. DE et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **The New**, v. 347, n. 25, p. 1999–2009, 2002.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, 2014.

- WANG, J. et al. Transcriptome Profiling Reveals PHLDA1 as a Novel Molecular Marker for Ischemic Cardiomyopathy. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 65, n. 1, p. 102–109, 2018a.
- WANG, R. et al. Protein kinase C regulates Fas (CD95/APO-1) expression. **Journal of immunology**, v. 161, n. 5, p. 2201–2207, 1998.
- WANG, X. et al. The expression of TSSC3 and its prognostic value in patients with osteosarcoma. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 79, n. 1, p. 23–26, 2016.
- WANG, X. et al. PHLDA2 is a key oncogene-induced negative feedback inhibitor of EGFR/ErbB2 signaling via interference with AKT signaling. **Oncotarget**, v. 9, n. 38, p. 24914–24926, 2018b.
- WANG, X. et al. Phlda3 Overexpression Impairs Specification of Hemangioblasts and Vascular Development. **FEBS Journal**, v. 285, n. 21, p. 4071–4081, 2018c.
- WATANABE, T. et al. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 2, p. 164–175, 2012.
- WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010.
- WILLIAMSON, M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. **Biochemical Journal**, v. 297, n. 2, p. 249–260, 1994.
- WOLIN, K. Y.; TUCHMAN, H. Physical Activity and Breast Cancer Prevention. **Physical Activity and Cancer**, v. 186, n. 1, p. 13–42, 2011.
- WU, S. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor I insensitivity of fibroblasts isolated from a patient with an I κ B α mutation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 3, p. 1220–1228, 2010.
- YAM, C.; MANI, S.; MOULDER, S. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. **The oncologist**, v. 22, n. 1, p. 1086–1093, 2017.
- YAN, G. et al. TSSC3 represses self-renewal of osteosarcoma stem cells and Nanog expression by inhibiting the Src/Akt pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 85628–85641, 2017.
- YEH, I.; MCCALMONT, T. H.; LEBOIT, P. E. Differential expression of PHLDA1 (TDAG51) in basal cell carcinoma and trichoepithelioma. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 5, p. 1106–1110, 2012.
- YERSAL, O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications.

World Journal of Clinical Oncology, v. 5, n. 3, p. 412–424, 2014.

YOON, Y. Small chemicals with inhibitory effects on PtdIns(3,4,5)P₃ binding of Btk PH domain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 10, p. 2334–2339, 2014.

YUN, Z.; GLAZER, P. M. Tumor suppressor p53 stole the AKT in hypoxia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 6, p. 2264–2266, 2015.

ZHAO, G. S. et al. TSSC3 promotes autophagy via inactivating the Src-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway to suppress tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma, and predicts a favorable prognosis. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2018.

ZHAO, P. et al. Downregulated expression of PHLDA1 protein is associated with a malignant phenotype of cholangiocarcinoma. **Oncology Letters**, v. 10, n. 2, p. 895–900, 2015.

ZHAO, P.; LU, Y.; LIU, L. Correlation of decreased expression of PHLDA1 protein with malignant phenotype of gastric adenocarcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 5, p. 5230–5235, 2015.

ANEXOS

Anexo A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa FMUSP

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de expressão imuno-histoquímica dos membros da família PHLDA (Pleckstrin homology like domain family A) e potencial valor prognóstico em câncer de mama.

Pesquisador: Maria Aparecida Nagai

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04657018.2.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.108.505

Apresentação do Projeto:

O Projeto de Pesquisa esta apresentado de maneira clara e objetiva.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal deste Projeto de Pesquisa será o de avaliar o perfil de expressão protéica dos membros da família PHLDA (pleckstrin homology like domain family A) pela técnica de imuno-histoquímica em "Tissue microarrays" (TMA) de tecidos mamários embebidas em parafina de 575 amostras de câncer de mama que serão obtidas dos arquivos do Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A Pesquisa envolve análise de amostras retrospectivamente não trazendo nenhum risco imediato aos participantes. Tratando-se de um trabalho experimental, não trará benefícios aos participantes, entretanto o presente Projeto de Pesquisa pode contribuir para o melhor entendimento da relação entre o perfil de expressão proteica dos membros da família PHLDA e seu potencial valor prognóstico em câncer de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa tem importância por avaliar um grande número de amostras de participantes (n=575) e

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 3.108.505

avaliar a relação entre o perfil de expressão proteica dos membros da família PHLDA e seu potencial valor prognóstico em câncer de mama.

Conforme solicitado no parecer anterior o Pesquisador Responsável apresentou a documentação solicitada referente a utilização das amostras do TMA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do Protocolo de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Protocolo não apresenta pendências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1274063.pdf	07/01/2019 16:03:40		Aceito
Outros	CartaAnuencia_ACCamargo.pdf	07/01/2019 16:01:31	Maria Aparecida Nagai	Aceito
Outros	CartaCEP_FMUSP_Protocolo_444_18.pdf	07/01/2019 16:00:46	Maria Aparecida Nagai	Aceito
Outros	Formulario_CEP.pdf	12/12/2018 16:12:10	Flavia Regina Rotea Mangone	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	12/12/2018 16:08:43	Flavia Regina Rotea Mangone	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_CEP.pdf	11/12/2018 11:31:02	Maria Aparecida Nagai	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/12/2018 11:30:48	Maria Aparecida Nagai	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 3.108.505

SAO PAULO, 08 de Janeiro de 2019

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br