PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA

**Expressão imuno-histoquímica da proteína associada
ao gene GATA3 nos carcinomas mamários infiltrativos
iniciais e sua relação com parâmetros prognósticos
morfológicos e moleculares**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Carlos Simões
Dornellas de Barros

Coorientadora: Profa. Dra. Filomena Marino
Carvalho

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Priscila de Medeiros
Expressão imuno-histoquímica da proteína associada
ao gene GATA3 nos carcinomas mamários infiltrativos
iniciais e sua relação com parâmetros prognósticos
morfológicos e moleculares / Priscila de Medeiros
Souza. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Alfredo Carlos Simoes Dornellas de
Barros.
Coorientadora: Filomena Marino Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasia da mama 2.Fator de
transcrição GATA3 3.Imuno-histoquímica 4.Patologia
5.Prognóstico

USP/FM/DBD-004/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Maria Nascimento e Amauri, por todo o apoio e amor.

Ao meu esposo, Arthur, por seu incentivo e por ser minha inspiração de
dedicação e competência.

À minha filha Marina, por ter ressignificado minha vida e meus valores.

À minha irmã, Natália, por me acompanhar em todos as etapas de minha
vida.

Agradecimentos

A Deus, por tantas bênçãos em minha vida e pela oportunidade de ter acesso ao ensino.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alfredo Carlos Simões Dornellas de Barros por me acolher como aluna e me passar ensinamentos que vão muito além dos livros, com seu exemplo de dedicação e busca incessante pelo aprendizado.

À minha coorientadora, Prof. Dra. Filomena Marino Carvalho, pelo apoio na avaliação das lâminas, além da orientação e ajuda desde a elaboração do projeto até os últimos detalhes da tese.

Ao Dr. Fernando N. Aguiar, pelo suporte com a avaliação das lâminas e pelos ensinamentos sobre patologia mamária.

À Dra. Debora Gagliato pelo apoio e sugestões.

À Prof. Dra. Elia Caldini pela oportunidade e pelo incentivo constante.

A Alex Cassenote e à Marília Correia pelo suporte estatístico.

Às minhas colegas de pós-graduação, Danúbia, Larissa e Rebeca pelas experiências compartilhadas ao longo desses anos.

À todas as pacientes, as quais tenho a honra de participar de seus tratamentos. Agradeço pelo aprendizado em cada caso e por compartilharem comigo suas emocionantes e inspiradoras histórias de vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. Oncogênese mamária e fatores de transcrição	10
3.2. Fatores de transcrição GATA3: Fundamentos	14
3.3. GATA3 e o desenvolvimento das glândulas mamárias	19
3.4. Mutações no gene GATA3	21
3.5. GATA3 e câncer de mama	24
3.6. GATA3 e transição epitélio-mesênquima	28
3.7. GATA3 e carcinoma oculto da mama	30
3.8. GATA3 e prognóstico do câncer de mama	35
4. MÉTODOS	39
4.1. Modelo de estudo	40
4.2. Aspectos éticos	40
4.3. Seleção de pacientes	40
4.4. Análise histopatológica e imuno-histoquímica	41
4.5. Análise dos dados	44
5. RESULTADOS	51
5.1. Características clínico-patológicas	52
5.2. Achados histopatológicos	52
5.3. Dados imuno-histoquímicos e classificação em subtipos moleculares	53
5.4. Expressão de GATA3 nas células tumorais	53
5.5. Relação entre a expressão de GATA3 e parâmetros morfológicos	54
5.6. Relação entre expressão de GATA3 e parâmetros imuno-histoquímicos	55
5.7. Relação entre expressão de GATA3 e os subtipos imuno-histoquímicos	56
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

9. ANEXOS.....109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CM	Carcinoma de mama
CK8/18	Citoqueratinas 8 e 18
ENTPD3	Ectonucleosídio trifosfato difosfohidrolase 3
FOXA1	Gene Forkhead box A1
FOG1	Gene Friend of GATA1
GH	Grau histológico
GN	Grau nuclear
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
IMH	Imuno-histoquímica
IC	Intervalo de confiança
IVL	Invasão vasculo-linfática
pT	Tamanho do tumor invasivo no espécime cirúrgico
pN	<i>Status</i> axilar no espécime cirúrgico
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
RA	Receptor de androgênio
SOE	Sem outras especificações
TEM	Transição epitélio-mesênquima
VEGF	Vascular endothelial growth factor

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos marcadores utilizados nas reações imuno-histoquímicas	50
Tabela 2	Características clínico-patológicas da casuística total.....	57
Tabela 3	Parâmetros imuno-histoquímicos pesquisados na casuística total	58
Tabela 4	Classificação em subtipos imuno-histoquímicos dos tumores na casuística total.....	59
Tabela 5	Associação dos subtipos morfológicos e preservação ou redução de GATA3.....	60
Tabela 6	Associação dos subtipos morfológicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas	61
Tabela 7	Associação dos dados dos parâmetros histopatológicos e expressão de GATA3.....	62
Tabela 8	Associação entre parâmetros histopatológicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.....	63
Tabela 9	Associação entre parâmetros imuno-histoquímicos e preservação ou redução da expressão de GATA3.....	64
Tabela 10	Associação entre parâmetros imuno-histoquímicos e expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas	65
Tabela 11	Análise descritiva das variáveis quantitativas entre os indivíduos com e sem redução de GATA3.....	66
Tabela 12	Associação dos subtipos moleculares imuno-histoquímicos com a preservação ou redução da expressão de GATA3.....	67

Tabela 13	Associação dos subtipos imuno-histoquímicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas	68
Tabela 14	Associação da expressão de receptores de androgênio com a expressão de GATA3 no subtipo receptor de estrogênio negativo/HER2 negativo	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo estrutural do gene GATA3. A. Destaque para os dois domínios de ativação transcricional e dois dedos de zinco. B. Modelo associado à estrutura de éxons e principais mutações identificadas no GATA3 nos tumores de mama luminais A e B	37
Figura 2	Modelo estrutural ilustrando a interação de fatores de transcrição em dedo de zinco com a dupla hélice do DNA	38
Figura 3	Tecido mamário normal mostrando positividade nuclear para GATA3 em células epiteliais com forte intensidade. O padrão de expressão destas estruturas foi usado como controle interno da reação na neoplasia (40X)	45
Figura 4	Expressão imuno-histoquímica de GATA3 em 100% das células de carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial evidenciando-se coloração nuclear forte e difusa. Este padrão de coloração foi considerado como expressão positiva rica de GATA3 (100X).	46
Figura 5	Expressão imuno-histoquímica de GATA3 em 40% das células de carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial. Este padrão de coloração foi considerado como expressão positiva intermediária de GATA3 (100X)	47
Figura 6	Expressão imuno-histoquímica de GATA3 em 20% das células de carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial. Este padrão de coloração foi considerado como expressão positiva pobre de GATA3 (100X).	48
Figura 7	Expressão imuno-histoquímica de GATA3 negativa em carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial (100X).	49
Figura 8	Frequência da expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição das medianas dos valores de Ki67 entre os grupos com e sem redução de GATA3.....	71
------------------	---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Matriz de dispersão da expressão de GATA3, de Ki67 e de RE baseada em gráficos.....	72
-----------------	---	----

RESUMO

Souza PM. *Expressão imuno-histoquímica da proteína associada ao gene GATA3 nos carcinomas mamários infiltrativos iniciais e sua relação com parâmetros prognósticos morfológicos e moleculares* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

INTRODUÇÃO: GATA3 é um dos seis membros da família de fatores de transcrição GATA e tem importante papel na manutenção da diferenciação das células mamárias. A perda da expressão de GATA3 implica em falha na formação da unidade ducto-lobular. Mutações no gene GATA3 foram identificadas em carcinomas mamários, mais frequentemente nos tumores luminais. A sua expressão vem sendo associada a melhor prognóstico, tanto em tumores luminais como em tumores triplo-negativos. **OBJETIVOS:** Avaliar em geral a expressão da proteína GATA3 nos carcinomas infiltrativos mamários iniciais, determinar a frequência da identificação da proteína, verificar sua relação com parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos tumorais e pesquisar sua expressão nos diferentes subtipos moleculares imuno-histoquímicos. **MÉTODOS:** A proteína GATA3 foi pesquisada por imuno-histoquímica em 105 pacientes femininas, com diagnóstico histológico de carcinoma mamário invasivo inicial, submetidas a tratamento cirúrgico primário entre 2015 e 2019. A positividade de GATA3 foi considerada quando a coloração nas células foi superior ou igual a 1%. De acordo com a porcentagem de células neoplásicas coradas, a expressão de GATA3 foi classificada em negativa (ausência de coloração ou presente em fraca intensidade em menos de 1% das células neoplásicas), positiva pobre (coloração em até 20% das células), positiva intermediária (coloração entre 21% a 95% das células), positiva rica (coloração em 96% ou mais das células). Para efeito de análise estatística, a preservação da expressão de GATA3 nas células marcadas foi dividida em duas categorias: expressão preservada (positiva em intensidade forte em mais de 95% das células neoplásicas) e expressão reduzida (positiva intermediária, pobre ou negativa). Os graus de expressão de GATA3 foram analisados conforme parâmetros morfológicos, imuno-histoquímicos e subtipos moleculares. **RESULTADOS:** A expressão de GATA3 foi demonstrada na imensa maioria dos casos (98,1%). A preservação da expressão esteve associada com os seguintes parâmetros de melhor prognóstico: menor grau histológico, expressão de receptores hormonais, menor expressão da oncoproteína HER2 e menor taxa de proliferação celular (Ki67). Com relação aos subtipos moleculares imuno-histoquímicos, nos tumores RE positivos/HER2 negativos a expressão de GATA3 esteve mais frequentemente preservada (93,2% *versus* 6,7%) ($P < 0.001$). Já nos tumores RE negativos/HER2 positivos e RE negativos/HER2 negativos a expressão de GATA3 esteve mais comumente reduzida ($P = 0,001$). **CONCLUSÕES:** A expressão da proteína GATA3 está presente em quase todos os carcinomas invasivos iniciais da mama. Sua expressão preservada mostrou correlação positiva com fatores de bom prognóstico morfológicos e imuno-histoquímicos. A preservação da expressão difere conforme os diferentes subtipos moleculares imuno-histoquímicos, sendo muito frequente em carcinomas RE

positivos/HER2 negativos e relativamente rara em carcinomas RE negativos/HER2 negativos.

Descritores: Neoplasia de mama; fator de transcrição GATA3; imuno-histoquímica; patologia; prognóstico.

ABSTRACT

Souza PM. *Immunohistochemical expression of the protein associated with the GATA3 gene in early infiltrating breast carcinomas and its relationship with morphological and molecular prognostic parameters [thesis]*. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021".

INTRODUCTION: GATA3 is one of six members of the GATA transcription factors family and plays an important role in maintaining mammary cells differentiation. The loss of GATA3 expression implies failure in the formation of the ductal-lobular unit. Mutations in the GATA3 gene have been identified in breast carcinomas, more frequently in luminal tumors. Its expression has been associated with better outcomes, in luminal and in triple-negative tumors.

OBJECTIVES: To evaluate GATA3 expression in early infiltrating breast carcinomas, determine its frequency of identification, verify its relationship with histopathological and immunohistochemical parameters, assess the expression in the different immunohistochemical molecular subtypes. **METHODS:** The

GATA3 protein expression was evaluated by immunohistochemistry in 105 female patients with histological diagnosis of initial invasive breast carcinoma, who underwent primary surgical treatment between 2015 and 2019. GATA3 positivity was considered when at least 1% of the cells were stained. According to the proportion of stained tumor cells, GATA3 expression was classified in negative (absence or staining in low intensity in less than 1% of tumor cells), poor positive (staining in up to 20% of cells), intermediate positive (staining between 21% to 95% of cells), rich positive (staining in 96% or more of the cells). For statistical analysis, GATA3 expression was divided into two categories: preserved (positive expression in more than 95% of cells) and reduced (intermediate positive, poor or negative expression). GATA3 expression was analysed according to morphological and immunohistochemical parameters (histological type, HG, NG, LVI and pN) and molecular subtypes.

RESULTS: GATA3 expression was demonstrated in the vast majority of cases (98.1%). Expression preservation was associated with the following better prognosis parameters: lower histological grade, hormone receptors expression, lower HER2 oncoprotein expression and lower cell proliferation rate (Ki67). Regarding immunohistochemical molecular subtypes, in ER positive/HER2 negative tumors, GATA3 expression was more frequently preserved (93.2% vs 6.7%) ($P < 0.001$). In ER negative/HER2 positive and ER negative / HER2 negative tumors, GATA3 expression was more commonly reduced ($P = 0.001$).

CONCLUSIONS: GATA3 protein expression is present in almost all initial invasive breast carcinomas. Its preserved expression showed a positive correlation with molecular and anatomopathological good prognostic factors. The expression preservation differs among the various immunohistochemical molecular subtypes, being more frequent in ER positive/HER2 negative carcinomas and relatively rare in ER negative/HER2 negative carcinomas.

Descriptors: Breast cancer; GATA3 transcription factor; immunohistochemistry; pathology; prognosis.

O câncer de mama (CM) é a segunda neoplasia mais diagnosticada entre as mulheres no Brasil e no mundo, depois do câncer de pele não-melanoma. Relativamente raro antes dos 35 anos, sua incidência cresce de maneira progressiva — especialmente após os 50 anos — podendo ser observada tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. São diagnosticados mais de 2 milhões de casos de CM no mundo por ano¹. Nos Estados Unidos, foram estimados em 2019, 268.600 novos casos no sexo feminino e 2.670 no sexo masculino e morreram cerca de 630.000 indivíduos por esta neoplasia². O Instituto Nacional de Câncer estimou cerca de 66.000 novos casos no Brasil para o ano de 2020³.

Em 2000, Perou et al. identificaram através de microarranjos de DNAC, que o CM apresenta pelo menos quatro subtipos molecularmente distintos: luminal A, luminal B, basalóide e HER2-superexpresso, com diferentes características, as quais impactam tanto no comportamento clínico quanto na resposta terapêutica⁴.

Como a classificação molecular por microarranjo de DNAC é baseada em análise complexa de expressão gênica, torna-se difícil a sua implementação na prática. Uma classificação análoga, aproximada por modelos imuno-histoquímicos é mais factível, uma vez que existe elevada correlação entre os tumores classificados como receptor de estrogênio (RE) positivo e HER2 negativo em luminais A e B; RE negativo e HER2 negativo com basalóides e RE positivo e HER2 positivo ou RE negativo e HER2 positivo, com superexpressores de HER2⁵.

Com o objetivo de padronizar a classificação imuno-histoquímica, o consenso de especialistas de St Gallen em 2011 decidiu pela utilização

combinada de: receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e proteína Ki67, para a classificação dos tumores em luminal A, luminal B, HER2-superexpresso e triplo-negativo⁶.

Os tumores luminais são os subtipos mais comuns de CM. A denominação é advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células epiteliais mamárias normais⁷. Os tumores luminais são definidos patologicamente por apresentarem coloração de receptores de estrogênio e/ou de receptores de progesterona em $\geq 1\%$ das células⁸. Correspondem a cerca de 70% dos casos e apresentam sobrevida em média em 5 anos superior a 95% em tumores diagnosticados no estágio I⁹.

Os luminais A apresentam maior expressão de genes relacionados à via de sinalização estrogênica, e menor expressão de *clusters* de genes relacionados à proliferação celular¹⁰. Em contrapartida, os tumores luminais B têm menor expressão de proteínas receptoras de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e maior expressão de genes de proliferação (Ki67)¹¹. Além disso, os tumores luminais B têm maior expressão de receptores de fatores de crescimento¹².

No consenso de St Gallen de 2013, foi sugerida diferenciação da classificação imuno-histoquímica dos tumores luminais A e B. Os tumores luminais B foram definidos como aqueles com RE positivo, HER2 negativo, RP $< 20\%$ e ou Ki67 $>$ ou igual a 20% . Os tumores luminais A foram definidos como RE positivo, HER2 negativo, RP $> 20\%$ e Ki67 $< 20\%$ ¹¹.

Os tumores triplo-negativos representam 15% dos tumores de mama, caracterizando-se por expressão ausente ou deficiente de RE, RP e HER2.

Geralmente têm alto grau histológico, com enriquecimento de genes relacionados à proliferação celular e transição epitélio-mesênquima (TEM) e são biologicamente mais agressivos^{13,14}. A sobrevida em 5 anos para tumores no estágio I é de aproximadamente 85% e a sobrevida média das pacientes metastáticas é de 10-13 meses⁹.

Os carcinomas HER2 superexpressos, por sua vez, correspondem a cerca de 15-20% dos casos⁹. Tipicamente superexpressam receptor transmembrana HER2¹⁵. Em sua evolução natural, eram classicamente associados a pior prognóstico, panorama radicalmente alterado com a introdução da terapia-alvo anti-HER2, com trastuzumabe e pertuzumabe, utilizada em combinação com quimioterapia. A sobrevida em 5 anos de pacientes no estágio I é de aproximadamente 94%, as pacientes metastáticas têm sobrevida média de 4-5 anos⁹.

Vistas essas considerações, sobressai a importância do conhecimento das vias genético-moleculares implicadas na diferenciação e no comportamento biológico dos subtipos intrínsecos tumorais. Os fatores de transcrição tem função fundamental na carcinogênese e vêm sendo amplamente estudados no CM.

O fator de transcrição GATA3 está entre os fatores de transcrição mais importantes e bem estudados no CM¹⁶. Está bem caracterizado como um marcador sensível e relativamente específico, codifica a síntese da proteína de ligação GATA3, denominada neste texto simplesmente como GATA3, uma proteína linear com mais de 400 aminoácidos¹⁷.

A maioria dos carcinomas mamários, sejam primários ou metastáticos, apresentam expressão de GATA3 (80-90%), porém ela é mais frequentemente

expressa nos carcinomas luminais-like e menos frequente nos tumores não hormonais dependentes¹⁸.

GATA3 é um dos 6 genes membros da família de fatores de transcrição multifuncionais relacionados com desenvolvimento e função de células epiteliais da mama, urotélio, epiderme e alguns subtipos de linfócitos T¹⁹. É responsável pela transcrição de proteínas de ligação do DNA em dedo de zinco (série de proteínas que se enovelam em torno de um íon de zinco central, gerando um domínio compacto a partir de uma cadeia polipeptídica de tamanho relativamente pequeno)²⁰.

Na mama, os fatores de transcrição GATA3 têm papel de manter a diferenciação de células mamárias²¹. Essas proteínas nucleares reconhecem a sequência de nucleotídeos G-A-T-A em genes alvos, e são necessárias para a formação das unidades ducto-lobulares terminais¹². A expressão de GATA3 dificulta a transição epitélio-mesênquima, diminui a capacidade de iniciação tumoral em células progenitoras e inibe a disseminação metastática²².

Já a perda da expressão de GATA3 na glândula mamária adulta leva à proliferação celular desordenada e, em longo prazo, à morte celular mediada por caspases após o desprendimento das células luminais da membrana basal¹⁷. As caspases são proteases presentes no citosol que deflagram cascata de ativação que culmina em morte celular. A ativação das caspases pode ocorrer por fatores externos através de receptores específicos na superfície celular ou por estímulos internos de estresse intracelular. Nas células da glândula mamária, não parece haver ação direta do gene GATA3 na ativação de caspases, mas sim de forma indireta, através do desprendimento da célula da membrana basal induzido pela diminuição da expressão do gene GATA3²³.

GATA3 expressa-se tanto nas células epiteliais lumbais normais, como em células carcinomatosas. Davis et al. estudaram a expressão imuno-histoquímica do gene GATA3 nos tumores mamários e identificaram que a expressão de GATA3 foi presente em 115 de 119 (96,6%) carcinomas mamários RE positivos, 66 de 80 (82,2%) carcinomas HER2-positivos e 11 de 51 (21,6%) entre os triplo-negativos²⁴. A expressão imuno-histoquímica da proteína codificada por este gene é maior em tumores de baixo grau e sua maior expressão parece estar relacionada com melhor sobrevida^{25,26}.

Um melhor entendimento sobre como o fator de transcrição GATA3 regula a diferenciação das células lumbais e a sua eventual transformação maligna, e como modula a sensibilidade neoplásica à hormonioterapia, é fundamental para esclarecer suas possibilidades como fator prognóstico e de orientação terapêutica. Existem poucos dados na literatura sobre a relação entre GATA3 e os outros marcadores da doença, como parâmetros morfológicos e imuno-histoquímicos. Este é o foco deste trabalho.

Objetivo geral

Avaliar a expressão de GATA3 nos carcinomas infiltrativos mamários iniciais.

Objetivos específicos

1. Determinar a frequência da identificação de GATA3;
2. Verificar a relação de GATA3 com parâmetros histopatológicos tumorais;
3. Verificar a relação de GATA3 com parâmetros imuno-histoquímicos tumorais;
4. Pesquisar a expressão de GATA3 nos diferentes subtipos moleculares imuno-histoquímicos.

3.1. Oncogênese mamária e fatores de transcrição

Na expectativa da elucidação dos mecanismos de carcinogênese, modelos biológicos foram apresentados e detalhadamente estudados, como o clássico modelo linear por etapas, proposto Farber e Cameron e desenvolvido por Fearon e Vogelstein, e o modelo de evolução darwiniana como proposto por Nowell, que sugeriu a ausência de ordem de eventos ou de etapas desencadeadoras²⁷⁻²⁹.

Tais modelos embasaram diversas pesquisas e, mais recentemente, o sequenciamento genômico abriu novos horizontes, colocando em foco a imensa complexidade apresentada por neoplasias. Grande parte do sequenciamento foi demonstrado no *The Cancer Genome Atlas Project*, que catalogou as mutações somáticas e anormalidades estruturais do CM³⁰.

O câncer é resultado de alterações cumulativas no genoma tecidual que acabam por modificar o padrão de expressão de genes reguladores da multiplicação celular, os supressores tumorais e os oncogenes^{31,32}.

A iniciação genética do CM depende de duas forças antagônicas, que atuam de forma independente ou combinada: inativação de genes supressores tumorais e ativação de proto-oncogenes, de modo que a célula iniciada transmite a alteração às células-filhas e assim por diante. O CM hereditário é causado por inativação de genes supressores. Nos esporádicos, a alteração genética mais prevalente também é a inativação de genes supressores, como CDH1, p53, p16, CHEK-2 e PTEN. Entretanto, a ativação de oncogenes pode ser responsável pela iniciação, seja de forma exclusiva ou combinada, com a inativação de genes supressores tumorais³².

Para ser inativado, o gene supressor tumoral requer alteração nos dois cromossomos alelos, em padrão de herança dominante negativa. No câncer hereditário, o indivíduo já nasce com a mutação germinativa, que é verificada em todas as células do seu organismo e, durante a vida, precisa sofrer um dano estrutural no segundo alelo. No câncer esporádico, as duas alterações genéticas são do tipo somática³².

Com relação aos oncogenes, os principais proto-oncogenes ativados no carcinoma de mama são HER2, c-myc, ciclina D1, EGF, int-2, RAS e bcl-2. Todos são ativados por processo de amplificação, com exceção do RAS, que se deve à mutação pontual, e do bcl-2, que inibe a apoptose, cuja ativação se dá por translocação³³.

No caso dos oncogenes, a alteração genética é do tipo dominante, porque basta ocorrer a modificação em um dos cromossomos alelos para que a proteína deletéria seja produzida. De maneira geral, essas proteínas, como a HER2, são da família das tirosino-quinases de ação intracitoplasmática, impulsionadas por proteínas receptoras transmembrana, que são sensíveis a determinados fatores de crescimento e, que uma vez ativadas, são catalisadoras de reações de sinalização intracelular que desregulam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência das células³³.

Uma vez submetido às alterações iniciadoras, o clone celular modificado expande-se carregando a instabilidade genômica e apresenta suscetibilidade a novos danos no DNA. No entanto, para viabilidade e progressão dessas células, são necessárias outras alterações, como deficiência dos mecanismos de imunovigilância³⁴.

Já foi bem estabelecido o papel do microambiente tumoral, incluindo a interação com a matriz extracelular (MEC) e com o sistema imune. As células epiteliais são realmente dependentes de interações com componentes específicos da MEC para a sobrevivência, proliferação e diferenciação. Os mecanismos epigenéticos parecem ter um papel fundamental no estabelecimento e na progressão do câncer e sua desregulação já foi relatada em múltiplos níveis, incluindo a metilação do DNA, modificações de histonas e expressão de microRNAs^{35,36}.

O modelo de tumorigênese hereditário, conforme o tipo de clone celular primitivo, sugere que os tumores sejam mantidos em seu crescimento patológico por uma pequena subpopulação de células tumorais com propriedades de célula-tronco, ou seja, com potencial de autorrenovação desregulado, proliferação excessiva e diferenciação aberrante, com surgimento de células-filhas heterogêneas, produzindo heterogeneidade intratumoral^{37,38}.

Hanahan e Weinberg sugeriram que os tumores apresentam seis características que contribuem para a sua multiplicação celular desenfreada, dentre as quais: autossuficiência dos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de anti-crescimento, invasão tecidual e metástases, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e evasão à apoptose³⁹. Posteriormente, os mesmos autores sugeriram outras características associadas, tais como reprogramação do metabolismo de energia e evasão do sistema imune, além de instabilidade genômica e inflamação promotora de tumor⁴⁰.

Como fator contribuinte para a autossuficiência dos tumores, tem-se o surgimento de células que produzem um fator de crescimento e expressam o receptor cognato. Em alguns casos, as células tumorais enviam sinais para

ativar as células normais no estroma de suporte, o qual, por sua vez, produz fatores de crescimento que promovem o crescimento tumoral⁴¹.

Outro fator determinante da autossuficiência são os receptores de fatores de crescimento. Os receptores mutantes liberam sinais mitogênicos contínuos para as células, mesmo na ausência de fator de crescimento no ambiente, sendo a família do receptor fator de crescimento epidérmico (EGFR) um exemplo. O gene codificador de receptor HER2 está amplificado em cerca de 20% dos carcinomas de mama, sendo tumores bastante sensíveis a pequenas concentrações de fatores de crescimento⁴².

Um mecanismo relativamente comum, pelo qual as células cancerosas adquirem autonomia de crescimento, é através de mutações em genes codificadores de vários componentes das vias de sinalização dos receptores do fator de crescimento. Essas proteínas sinalizadoras acoplam-se ao fator de crescimento ativado e o transmitem ao núcleo. Dois membros importantes dessa categoria são RAS e ABL, proto-oncogenes mutados frequentemente nos tumores humanos⁴³.

Por fim, a sinalização através de oncoproteínas, como RAS ou ABL, leva à estimulação contínua de fatores de transcrição que impulsionam a expressão de genes promotores de crescimento. Assim, a autonomia do crescimento pode ser uma consequência de mutações que afetam os genes reguladores da transcrição do DNA. Grande número de produtos dos oncogenes, MYC, MYB, JUN, FOS e REL funciona como fatores de transcrição reguladores de expressão dos genes promotores de crescimento, como as ciclinas³⁹.

Uma das primeiras oncoproteínas a ser reconhecida como um fator de transcrição foi a JUN, cujo gene apresentou forma mutante no vírus de sarcoma

em aves⁴⁴, sendo exemplo de como o estudo do mecanismo de ação dos retrovírus contribuiu para o esclarecimento de algumas vias de carcinogênese.

Diversas pesquisas levaram à identificação de que JUN faz parte de um complexo de transcrição dímero, chamado AP-1, que consiste em duas subunidades de proteínas de regulação de crescimento JUN e FOS, já conhecida como agente oncogênico no vírus FBJ do osteossarcoma. A partir deste precedente, outros numerosos fatores de transcrição oncogênicos pertencentes a diversas famílias foram descobertos⁴⁵.

Outro exemplo de oncoproteína que funciona como fator de transcrição é a p53 a qual atua diretamente em associação com o DNA. Há ainda uma terceira classe de fatores de transcrição, cuja perda contribui para a transformação maligna. Dentre estes fatores, podemos incluir as proteínas GATA, que normalmente promovem a diferenciação celular. A função prejudicada ou a redução da expressão contribui para a transformação maligna devido à falha da célula afetada em atingir a maturidade e seguir o ciclo celular⁴⁶.

3.2. Fatores de transcrição GATA3: Fundamentos

Os fatores de transcrição da família GATA consistem em seis componentes e são reguladores essenciais da diferenciação de numerosos tecidos. Todos compartilham dois dedos de zinco do tipo C2H2 que medeiam não apenas a ligação do DNA, mas também a maioria das interações proteicas. Os fatores GATA normalmente ligam-se ao elemento A/T GATA A/G do DNA⁴⁶.

Inicialmente, GATA1, GATA2 e GATA3 foram classificados como fatores hematopoiéticos, enquanto GATA4, GATA5 e GATA6 foram determinados

como fatores endodérmicos. No entanto, esta categorização não faz justiça à vasta distribuição tecidual das proteínas GATA. Por exemplo, GATA3 tem uma função primordial nas células T linfocitárias, mas também é um regulador importante nas células epiteliais mamárias²¹.

Fatores de transcrição GATA podem atuar em progenitores celulares indiferenciados e ter papel na sua proliferação, ou podem coordenar diretamente a maturação de células diferenciadas. Portanto, é esperado que as alterações nos fatores GATA contribuam para o desenvolvimento de câncer em humanos.

Os fatores GATA1 e GATA3 têm sido classicamente relacionados ao desenvolvimento de carcinomas tanto em modelos animais como em humanos. O fator de transcrição GATA1 foi o primeiro a ser identificado. Tendo sido observada sua capacidade de ligar-se a elementos GATA nas regiões regulatórias nos genes de eritrócitos. Atualmente, sabemos que GATA1 regula a maioria, senão todos os genes eritrócito-específicos. Além disso, ficou estabelecido que GATA1 tem papel crítico nas demais linhagens hematopoiéticas, incluindo mastócitos, eosinófilos e megacariócitos⁴⁷.

Ratos com deleção do gene GATA1 apresentam níveis de anemia incompatíveis com o desenvolvimento, decorrente da falha na maturação e apoptose de precursores eritróides. Dependendo do sítio e do tipo de mutação, a severidade da anemia e trombocitopenia varia: algumas mutações reduzem a habilidade do GATA1 ligar-se ao FOG1 (Friend-of-GATA-1, proteína nuclear), enquanto outras prejudicam a ligação com DNA⁴⁸.

Com relação ao mecanismo de oncogênese, diversas hipóteses foram estudadas — a maioria em ratos — mostrando que GATA1 não apenas controla a expressão de genes que estabelecem o fenótipo eritróide, mas

também participa do ciclo celular. Por exemplo, GATA1 contribui diretamente para o silenciamento de genes associados à proliferação celular como *kit*, *Myc* e *Myb*, que são protooncogenes. Falha em silenciar esses genes implica proliferação de células eritróides imaturas⁴⁹.

Tendo em vista que a deficiência de GATA1 em modelos animais levou à hiperproliferação de megacariócitos imaturos, foi observada a associação com leucemias mielóides. As mutações GATA1 foram associadas apenas à leucemia mielóide relacionada à síndrome de Down, tendo sido o primeiro exemplo do papel da mutação em GATA1 apresentando função no desenvolvimento de câncer em humanos⁵⁰.

Vários tipos de mutações, todas na porção N-terminal de GATA1, foram catalogadas nos pacientes apresentando leucemia mielóide aguda relacionada à síndrome de Down, como inserções, deleções, mutações *splice*, mutações *non-sense* e mutações *mis-sense*. Todas as mutações levaram à inibição do códon de início produzindo um GATA1 alterado chamado GATA1s (GATA1 *short*) que não tem os 83 aminoácidos da porção N-terminal. O GATA1s não é suficiente para ocasionar a leucemia mielóide, porém, a associação com a trissomia do 21 — que apresenta outras predisposições a proliferações malignas — aumenta as chances de carcinogênese⁵⁰.

O gene GATA3 é um dos seis membros da família de fatores de transcrição GATA e, assim como os outros membros da família, apresenta uma estrutura central hexanucleotídica, (A/T)GATA(A/G). O gene GATA3 está localizado no cromossomo 10p14 e consiste de seis éxons^{51,52}.

Yang et al. definiram o domínio funcional do gene e chegaram a conclusão de que o produto de transcrição de GATA3 apresenta basicamente dois

segmentos proteicos distintos: os aminoácidos 31-59 são necessários para funcionamento do primeiro domínio de ativação transcricional (TAI) e os aminoácidos 132-214 foram definidos como o segundo domínio ativação transcricional (TAII). Esses domínios realizam contato com os fatores gerais de transcrição, atuando como áreas de modulação do DNA via ligantes (figura 1)^{53,54}. Os dedos de zinco são parte do domínio estrutural do GATA3. São proteínas que se enovelam em torno de um íon de zinco central gerando um domínio compacto a partir de uma cadeia polipeptídica. O nome “dedo de zinco” foi cunhado porque o diagrama bidimensional dessa estrutura se assemelha a um dedo (figura 2)²⁰.

A deleção do primeiro dedo de zinco da porção amino-terminal não ocasionou impacto na ligação com DNA, no entanto, resultou em aumento na função de transativação. Em contrapartida, a deleção do segundo dedo de zinco aboliu a ligação com DNA e ativação transcricional⁵³.

GATA3 foi inicialmente identificado na busca de fatores de transcrição GATA na linhagem de células T^{55,56}. Apresenta um papel essencial no desenvolvimento inicial das células T e na diferenciação em Th2⁵⁶⁻⁵⁸. Também foram observadas funções importantes em outras células, como o papel no desenvolvimento de estruturas epiteliais da glândula mamária^{17,59}, pele, ouvido interno, tecido adiposo, sistema nervoso central e rins²¹.

No tecido adiposo, em modelos animais, os genes GATA2 e GATA3 são especificamente presentes nos precursores adipócitos e a sua expressão suprimiu a diferenciação destes, permanecendo as células no estágio de pré-adipócitos. Este efeito é mediado, pelo menos em parte, pela supressão direta do receptor γ . Células embrionárias deficientes de GATA3 exibem uma

capacidade aumentada de diferenciar-se em adipócitos e a expressão defectiva de GATA2 e GATA3 está associada à obesidade⁶⁰⁻⁶².

Os fenótipos endoteliais são regulados por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. A expressão de GATA3, GATA2 e GATA6 foi observada em células endoteliais de grandes vasos, GATA3 apresentando os maiores níveis de expressão. Em microarranjos de DNA de células endoteliais de cordão umbilical humano, a diminuição de expressão de RNA resultou em diminuição da expressão de genes associados com a angiogênese, incluindo Tie2⁶³.

Tie2 é um receptor de proteína tirosina-quinase que é especificamente expresso em células endoteliais. Tie2 é ativado pelo seu ligante, angiopoietina-1 (Ang-1). A Ang-2 é um antagonista funcional da Ang-1. A ligação de Ang-1 a Tie2 resulta em autofosforilação rápida do receptor, que por sua vez medeia a sobrevivência das células endoteliais, a migração celular, a angiogênese e a função de barreira^{64,65}. A disrupção direcionada de Ang-1 ou Tie2 resulta em letalidade embrionária devido a interações anormais entre células endoteliais e células murais e acentuado comprometimento da integridade vascular⁶⁶. Tie2 também desempenha um papel importante na vasculatura adulta. Por exemplo, a sinalização de Ang-1-Tie2 induz a neoangiogênese e promove um fenótipo anti-inflamatório^{67,68}.

Song et al. demonstraram que o GATA3 é essencial para mediar a expressão de Tie2 e a sinalização de Ang-1-Tie2. Esses achados apontam um importante papel do GATA3 na biologia celular endotelial⁶³.

Os fatores de transcrição criam uma complexa rede regulatória de genes que ajustam a expressão gênica para atender às demandas fisiológicas. O rompimento dessas redes reguladoras está associado a numerosas patologias,

inclusive câncer. RE-alfa, FOXA1 e GATA3 são fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento da glândula mamária e no câncer de mama. Mutações no GATA3 estão associadas a mudanças conformacionais no complexo RE-alfa-FOXA1-GATA3, levando a diminuição da ligação à cromatina⁶⁹.

3.3. GATA3 e o desenvolvimento das glândulas mamárias

A expressão de GATA3 tem sido observada em todos os estágios do desenvolvimento mamário, estando restrita às células luminais e ausente nas células mioepiteliais⁷⁰. A importância do GATA3 para o desenvolvimento mamário tem sido avaliada em diversas formas, inclusive observando-se as consequências da perda de função desse gene.

Experimentos envolvendo grupo de ratos com supressão do gene mostraram impactante desregulação do desenvolvimento mamário¹⁷. Kouros-Mehr et al. desenvolveram um trabalho com ratos sem alteração na expressão de GATA3 e outro grupo com expressão alterada do gene e compararam o desenvolvimento mamário. No 19º dia pós-parto, apresentaram uma glândula mamária rudimentar, semelhante às glândulas dos ratos do grupo controle. Porém, no período da puberdade, as glândulas mamárias falharam em desenvolver-se. Na quinta semana de pós-parto, o epitélio ductal luminal não invadiu a gordura estromal e permaneceu compacta. Na oitava semana pós-parto, algumas poucas unidades ductolobulares emergiram nas glândulas mamárias dos ratos experimentais, porém incapazes de preencher o estroma com 30 semanas pós-parto, sugerindo que GATA3 apresenta um papel

essencial na diferenciação das unidades ductolobulares. Além do desenvolvimento pouco expressivo, os ratos experimentais apresentaram defeitos estruturais grosseiros, como diâmetro luminal irregular e deficiência de ramificação da árvore ductal¹⁷.

No contexto de indução da deleção de GATA3 em células mamárias já diferenciadas, observou-se proliferação de células luminais com perda de marcadores de diferenciação celular, como E-caderina e β -caseína. Em última análise, células privadas da ação da proteína GATA3 desgarraram-se da membrana basal, o que resultou na morte mediada por caspases no lúmen ductal, indicando que a expressão de GATA3 é necessária para manter a diferenciação de células luminais em glândulas mamárias adultas²¹.

A deleção aguda de GATA3 nas glândulas mamárias adultas resulta em modificações na progressão do ciclo celular. Estudos realizaram coloração de lâminas com células mamárias sem alterações da expressão de GATA3 e lâminas com células que apresentaram deleção do gene. Na coloração por queratina 18 e queratina 14 (marcador de células mioepiteliais), as células com deleção coraram-se apenas com queratina 18, sugerindo que estas células mantiveram características luminais e não se diferenciaram em células mioepiteliais. Houve diminuição da coloração para β -caseína, E-caderina e ausência de receptores α RE nas células com deleção de GATA3, as quais se desprenderam da membrana basal¹⁷.

A perda de função do fator de transcrição GATA3 em células mamárias leva à proliferação celular desregulada, o que sugere que GATA3 provavelmente pode apresentar um papel direto na manutenção do estado de diferenciação de células luminais^{15,22}.

3.4. Mutações no gene GATA3

As células tumorais apresentam taxas elevadas de mutação em sítios regulatórios e diferentes mutações no mesmo gene podem ter papéis distintos na carcinogênese^{71,72}. Considera-se que a maioria das mutações sejam concordantes quanto à tumorigênese, no entanto, os genes num mesmo tipo tumoral podem apresentar ganho ou perda de função a depender da mutação o que implica em variações no comportamento biológico^{73,74}.

O CM é heterogêneo e quatro genes condutores (*driver genes*) estão simultaneamente mutados em pelo menos 10% dos pacientes^{30,75-77}: PIK3CA (codifica a subunidade catalítica de PI3K), CDH1 (codificando a E-caderina), TP53 (repara o DNA lesado) e GATA3 (transcreve a proteína de ligação GATA3). Enquanto os papéis da via PI3K, da adesão celular e p53 foram bem estudados, menos informações são conhecidas sobre o papel do gene mutado GATA3⁷⁸.

Mutações somáticas no gene GATA3 têm sido identificadas principalmente nos tumores dos subtipos luminais A e B. Perou et al., no estudo publicado pelo Cancer Genome Atlas Network, mostraram mutações no GATA3 em 14% dos tumores luminais A e 15% dos tumores luminais B, sendo a segunda mutação mais frequente nos tumores luminais A (após PIK3CA) e a terceira mais frequente nos tumores luminais B (depois de PIK3CA e TP53)³⁰.

Emmanuel et al. indicaram que as mutações no gene GATA3 codificam fatores de transcrição ativos que induzem fenótipos proliferativos

tanto no epitélio mamário normal como promovem o crescimento em células de câncer de mama RE positivas⁷⁹.

A maior parte dos conhecimentos sobre a potencial função do GATA3 no CM tem sido revelada em estudos genômicos que evidenciaram correlação entre fatores de transcrição luminais RE/FOXA1/GATA3 em modelos de células tumorais RE positivas⁸⁰⁻⁸². A observação de *downregulation* de GATA3 durante a progressão tumoral e presença de mutações *frame-shift* implicam que GATA3 atue inicialmente como supressor tumoral^{22,83}.

No entanto, surpreendentemente, Mair et al. demonstraram diferentes fenótipos tumorais quando distintas mutações GATA3 foram observadas. O tipo de mutação mais comum resulta em proteína com terminal C alongado, que mostra efeitos consistentes com atividades de “ganho-de-função” em modelos celulares. Também foi descrita uma interação sintética letal entre este GATA3 mutante e drogas com alvo nas histonas metiltransferases G9A e GLP, sugerindo a primeira possibilidade de estratégia terapêutica para pacientes carreadoras de mutações GATA3. De forma geral, o estudo mostrou que diferentes mutações no mesmo gene podem resultar em diferentes sensibilidades às drogas e contestar a ideia de que GATA3 atue apenas como um supressor tumoral⁷⁸.

A maioria das mutações no gene GATA3 estão localizadas nos éxons 5 e 6⁸⁴⁻⁸⁶; as associadas ao câncer de mama estão localizadas principalmente no segundo dedo de zinco e no domínio C-terminal. As principais mutações somáticas associadas ao CM apresentam alterações estruturais, em parte ou todo do segundo dedo de zinco. Estas mutações resultam em perda da ligação com o DNA⁸⁷.

No trabalho de Usary et al. a presença ou ausência de mutações no gene GATA3 no CM não pôde ser sugerida com resultado de imuno-histoquímica. Entretanto, cinco dos oito tumores de mama com mutações no gene GATA3 apresentaram coloração imuno-histoquímica. A coloração desses tumores provavelmente deve-se à expressão da proteína GATA3 normal do alelo selvagem e/ou à detecção da proteína mutada pelo anticorpo GATA3. Mais de 50 mutações no GATA3 já foram identificadas em tumores de mama⁸⁶. A maioria dessas mutações (> 95%) foram identificadas em tumores luminais A ou B⁸⁵, sendo mais frequentes nos tumores luminais A.

As proteínas mutantes resultam em efeitos deletérios com pelo menos três mecanismos que incluem: ausência de localização nuclear, falta de ligação com DNA e redução da ativação transcricional.

Takaku et al. sugeriram que tumores de mama apresentam comportamento diferente a depender das mutações que carregam, uma vez que as mutações variam não apenas entre os genes, como um único gene pode ser acometido por diferentes mutações. Habitualmente, as mutações no GATA3 são observadas mais frequentemente nos tumores luminais A, no entanto, mutações no segundo dedo de zinco, frequentemente resultam em tumores luminais B e pior prognóstico. Mutações do tipo *splice* e *truncation* são mais frequentes em tumores luminais A⁸⁸.

3.5. GATA3 e câncer de mama

O CM pode ser dividido em tumores com receptores hormonais positivos ou negativos. Tumores de mama que apresentam expressão de RE, são geralmente, bem diferenciados e cursam com bom prognóstico. Já os tumores RE negativos são menos diferenciados e exibem pior prognóstico. Em estudos de caracterização dos tumores por tecnologia *microarray*, GATA3 emergiu como um fator prognóstico forte e independente para CM. A pouca expressão de GATA3 foi fortemente associada a grau histológico mais alto, acometimento linfonodal, maior tamanho tumoral, receptor hormonal negativo e superexpressão de HER2⁸⁹.

Trata-se de um gene regulador que guia as células da mama imaturas em células epiteliais maduras. Está relacionado a outros dois genes regulatórios: FOXA1 e RE-alfa. Acredita-se que a expressão de GATA3 e RE-alfa sejam codependentes e que a perda da expressão de GATA3 resulte em queda da expressão de RE-alfa²⁴.

Wilson et al. realizaram uma metanálise de microarranjos de câncer humano que sugeriu que o GATA3 era parte integrante da via alfa do receptor de estrogênio⁹⁰.

A expressão de GATA3 tem sido associada a tumores receptores hormonais positivos, enquanto a baixa expressão, com tumores receptores hormonais negativos⁹¹. Em acordo, a expressão ectópica de GATA3 resulta em reversão da transição epitélio-mesênquima, inibição da disseminação e metástases, indução de diferenciação em células de CM em modelos de rato. Já os tumores com baixa atividade GATA3 estão associados à invasão e

desdiferenciação¹⁷. No entanto, a participação do GATA3 no desenvolvimento de CM é complexa, visto que alguns autores mostram que a expressão do fator GATA3 pode estar relacionada à tumorigênese e, assim, mecanismos de ação diferentes são associados ao desenvolvimento de tumores RE positivos e negativos. Parece haver alteração na expressão de GATA3 tanto nos tumores luminais (hiperexpressão), como nos basais (hipoexpressão)⁹¹.

Apesar da relação entre expressão de GATA3 e RE, a positividade de GATA3 em tumores triplo-negativos varia de 21,6% a 46%, sugerindo uma via de regulação do GATA3 independente do RE. Kim et al. avaliaram a expressão de GATA3 em diferentes subtipos de tumores triplo-negativos, esta foi mais frequente no grupo de tumores com características moleculares apócrinas, grupo que expressa outras vias hormonais como as do receptor de androgênio. A via de RA pode compensar a falta de expressão de RE e viabilizar a rota para expressão de GATA3⁹².

Severson et al. avaliaram a ação dos receptores hormonais esteróides, incluindo o receptor de estrogênio alfa (RE-alfa), o receptor de androgênio (RA), o receptor de progesterona (RP) e o receptor de glicocorticóide (RG) em tumores de mama masculino e feminino. Identificaram diferentes interações com os receptores hormonais a depender do sexo, o que poderia justificar a diferença de sobrevida entre homens e mulheres acometidos⁹³.

A recorrência à distância e metástase continuam sendo a principal causa de morte por câncer de mama. O estudo dos mecanismos que culminam com esse desfecho é complexo. Alguns estudos demonstram que GATA3 suprime a disseminação do câncer de mama por inibir a transição epitélio-mesênquima e inibir outras alterações do microambiente tumoral, como angiogênese,

remodelamento do colágeno e proteólise⁹⁴. Li et al. demonstraram que GATA3 reduz o nível de ATP no microambiente do câncer de mama e inibe a metástase pela formação do complexo GATA3-ENTPD3-eATP, resultando na *up-regulation* do ectanucleosídio trifosfato difosfohidrolase 3 (ENTPD3)⁹⁵.

O ATP no microambiente (extracelular) apresenta comportamento pró-metastático, por aumentar a concentração intracelular de cálcio, o que em associação a outros mecanismos, predispõe à transição epitélio-mesênquima. Já foi previamente demonstrado que a concentração de ATP extracelular (ATPe) é cerca de 1.000 vezes maior no tecido tumoral do que no tecido normal⁹⁶. O ENTPD3 pertence à família de enzimas que degradam o ATP no meio extracelular em ADP/AMP e inibe a migração celular induzida pelo ATPe.

Outro mecanismo que demonstra a participação do GATA3 no processo de inibição da metástase é a formação do complexo GATA3-UTX. A proteína transcrita UTX parece ter uma ação complementar ao GATA3. Yu et al. realizaram experimentos de ganho e perda de função e identificaram que a depleção, seja do GATA3 como do UTX, levou à redução de expressão de marcadores epiteliais e indiferenciação celular. A depleção apenas no UTX também foi capaz de desencadear esse processo⁹⁷.

As mutações identificadas nos tumores metastáticos são diferentes dos tumores primários, sugerindo que vão sendo adquiridas novas mutações ao longo da doença. Bertucci et al. avaliaram 617 tumores de mama metastáticos e identificaram que as mutações mais frequentes no cenário metastático foram: TP53 (47%), PIK3CA (30%), GATA3 (18%), ESR1 (17%), KMT2C (10%), CDH1 (9%), PTEN (7%) e NF1 (7%). Mutações adicionais nos tumores metastáticos em relação ao primário são mais frequentes nos tumores

receptores de estrogênio positivos do que nos triplo-negativos e HER2 sugerindo que a hormonioterapia poderia induzir o surgimento de mutações⁹⁸.

GATA3 também faz parte de outros complexos de regulação de células luminais. O LSD1, uma dimetilase de histonas, regula a expressão de GATA3 e o LSD1 inibe a expressão do oncogene TRIM37, em parte através do GATA3⁹⁹.

Nos tumores RE positivos, as mutações são frequentes nas subunidades do complexo de remodelamento da cromatina SWI/SNF, a subunidade mais frequentemente mutada é a ARID1A. O complexo SWI/SNF remodela a estrutura da cromatina, modula a transcrição e viabiliza a ligação de fatores de transcrição. As mutações neste complexo são observadas frequentemente em tumores metastáticos com resistência à endocrinoterapia. Também observou-se que a perda da subunidade ARID1A induz ao aumento do fenótipo basal¹⁰⁰.

Para delinear o mecanismo pelo qual a perda de ARID1A induz a aumento do fenótipo basal e resistência à endocrinoterapia, Xu et al. examinaram as consequências da perda da subunidade em tumores de mama e identificaram que a perda resulta em redução do acoplamento dos fator de transcrição GATA3¹⁰¹.

Encinas et al. estudaram as mutações BRCA1 e BRCA2 em pacientes muito jovens (≤ 35 anos) brasileiras e as mutações somáticas em tumores luminais HER2 negativo. Identificaram que entre brasileiras muito jovens, a frequência de mutação BRCA1 e BRCA2 foi de 16%, compatível com o que foi identificado em outros países. Nos tumores luminais de pacientes muito jovens, os *driver genes* mais frequentes foram PIK3CA, GATA3 e TP53¹⁰².

3.6. GATA3 e transição epitélio-mesênquima

A transição epitélio-mesênquima é uma modulação do fenótipo celular rápida e reversível, através da qual, propriedades epiteliais das células (como adesão, polaridade apical-basal e expressão de E-caderina) tornam-se prejudicadas. Concomitantemente, a expressão aumentada de proteínas mesenquimais, como N-caderina e vimentina, resulta em características fenotípicas invasivas, como motilidade celular. Três tipos de TEM têm sido descritas: tipo 1 bem definida e associada com o crescimento embrionário normal e diferenciação dos tecidos; tipo 2 é o mecanismo de cicatrização e reparo tecidual e tipo 3 é relacionada com a progressão tumoral e aumento da capacidade invasiva e migratória das células neoplásicas¹⁰³.

Através da TEM, as células tumorais passam a exibir habilidade de desprender-se de sua origem, invadir o estroma adjacente, embolizar por via linfática e/ou hematológica, eventualmente sobreviver e voltar a se multiplicar em um sítio distante: processo definido como metástase tumoral¹⁰⁴.

A perda da E-caderina tem sido demonstrada como pré-requisito e limitante da taxa de TEM na metástase tumoral¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Além da alteração genética, uma modificação epigenética no gene da E-caderina também desempenha papel na transformação de tumores malignos. Por exemplo, o *status* de metilação ou hipermetilação do gene da E-caderina foi intimamente associado com TEM e estágios metastáticos^{91,108}.

Yan et al. identificaram relação positiva entre a expressão de GATA3 e E-caderina. Células que tiveram a expressão de GATA3 diminuída apresentaram, conseqüentemente, E-caderina menos ativa e maior capacidade

de invasão e desenvolvimento de metástases tumorais à distância. Em modelos animais, também foi identificado que GATA3 inibe o crescimento do tumor primário, sugerindo que deva regular outro supressor tumoral e/ou oncogene em adição à E-caderina, todos participantes da iniciação e desenvolvimento tumorais¹⁰⁴.

Alguns estudos mostraram que GATA3 forma o complexo GATA3/G9A/NuRD para inibir um dos genes-chave da transição epitélio-mesênquima, inibindo assim o desenvolvimento de metástases à distância. Si et al. identificaram através de experimentos de ganho e perda de função, que a expressão de GATA3, G9A ou NuRD resultou em indução, tanto em nível de RNAm como de proteína, de marcadores proteicos epiteliais, como E-caderina, α -catenina, γ -catenina, e redução de marcadores mesenquimais como N-caderina, fibronectina e vimentina¹⁰⁹. Zeng et al. identificaram que a expressão de GATA3 pode suprimir a transição epitélio-mesênquima induzida pelo fato de crescimento β através da ativação do miR-455-3p e do complexo NuRD¹¹⁰.

A expressão da E-caderina tem efeito inibitório em relação à progressão tumoral, invasão e metástase tem alta expressão no tecido mamário normal. E-caderina é considerada um supressor tumoral, que tem papel fundamental na manutenção da morfologia de células epiteliais e reconhecimento intercelular¹¹¹.

É interessante e de aparência paradoxal, mas apesar da perda da expressão de E-caderina, as células do carcinoma lobular infiltrativo mantêm características morfológicas epiteliais¹¹², expressão de citoqueratinas epiteliais (CK8/18 e CK19)^{113,114}, sugerindo-se que o carcinoma lobular apresente TEM

parcial ou incompleta^{115,116} e que outros fatores genéticos e enzimáticos sejam necessários para TEM¹¹⁷.

3.7. GATA3 e carcinoma oculto de mama

Apesar dos avanços nos meios diagnósticos, como exames de imagem, a identificação do sítio primário de carcinoma oculto que se apresentam metastáticos ao diagnóstico, permanece como importante desafio. A avaliação imuno-histoquímica desempenha papel importante na identificação de sítio primário de carcinomas apresentando linfonodos axilares atípicos^{118,119}.

O CM, por ser o câncer mais comum em mulheres, entra no diagnóstico diferencial de quase todas as situações de pesquisa de sítio primário neste gênero. De forma que é fundamental o conhecimento dos principais marcadores utilizados. Os marcadores diagnósticos, por sua vez, apresentam limitações como a sensibilidade muito variável entre os estudos, além de variações determinadas pelo tipo de material estudado.

Dentre os marcadores para identificação do câncer de mama, tem-se o RE, porém não é um marcador sensível nem específico para o CM tendo em vista que no cenário metastático, apenas 50% dos tumores apresenta positividade para RE, quando comparado a 75-80% no tumor primário¹²⁰. Além disso, o RE é expresso em outros carcinomas, incluindo endométrio e ovário, e também em sítios pouco comuns como carcinoma papilífero da tireóide e tumores anexiais da pele. Portanto, RE não apresenta papel relevante na identificação de sítios primários¹¹⁹.

A proteína do fluido da doença macrocística (do inglês, gross cystic disease fluid - GCDFP-15) é uma secreção da mama composta por algumas glicoproteínas, identificada no citoplasma de células tumorais de CM em 55% dos casos (marcador citoplasmático). Kandalaft et al. relataram sensibilidade variando de 23-73%. A sensibilidade do GCDFP-15 para o CM é claramente dependente do tipo histológico. A sensibilidade é maior em tumores que apresentam características apócrinas e em carcinomas lobulares com características de células em anel de sinete¹²¹.

Mamaglobina é também um marcador citoplasmático. Kandalaft et al. descreveram que sua sensibilidade é comparável ou um pouco maior que a da GCDFP-15, variando entre 50-70%. No entanto, a expressão de mamaglobina também não está associada apenas a carcinomas primários da mama, também presente em tumores de glândulas salivares e tumores de endométrio. A especificidade da mamaglobina varia entre 90-100%¹²¹.

Bonacho et al. mostraram sensibilidade de 90% do marcador GATA3 e que assim como os outros marcadores, também tem menor sensibilidade nos tumores triplo-negativos de mama e chegou a apresentar 100% de sensibilidade nos tumores lobulares. A especificidade do GATA3 varia entre 70-90%. GATA3 também é expresso em tumores uroteliais, tumores de pele e glândulas salivares. Outrossim, foi identificada sua expressão em outros tumores como tireóide, adenocarcinoma de pulmão, mesoteliomas, colangiocarcinomas, carcinomas pancreáticos¹²².

Os derrames cavitários malignos de sítio primário desconhecido podem representar um dilema de diagnóstico para o citopatologista. A causa mais comum de derrame pleural maligno é o adenocarcinoma de pulmão seguido de

mama em mulheres e câncer gastrointestinal¹²³. Estima-se que derrames pleurais possam representar a manifestação inicial de malignidade em 13% dos casos e 50% dos indivíduos com câncer metastático desenvolverão um derrame pleural em algum estágio de sua doença¹²⁴⁻¹²⁶.

GATA3 emergiu como um marcador multiespecífico, bem eficiente, principalmente para carcinomas mamários e uroteliais em espécimes cirúrgicos e citológicos, em focos primários ou metastáticos^{127,128}.

Mohamed et al. identificaram a sensibilidade de 89,28% do GATA3 para carcinoma de mama metastático, semelhante à sensibilidade de 90% relatada anteriormente em preparações de fluidos serosos por Shield et al.¹²⁸, e de 93,5% relatada por Lew et al.¹²⁹. GATA3 também é útil quando pesquisado em blocos celulares preparados a partir de material de aspiração com agulha fina (PAAF) com sensibilidade de 80%, mais sensível em comparação a outros marcadores mamários, GCDFP15 14% e mamaglobina 26%¹³⁰.

Desta forma, GATA3 tem mostrado maior sensibilidade nos carcinomas mamários, tanto no nível protéico quanto no RNAm, que o GCDFP15 e mamaglobina, marcadores que vem sendo utilizados classicamente como imunomarcadores de origem mamária no contexto de lesões metastáticas.

Krings et al. estudaram GATA3 em carcinomas mamários triplo-negativos e compararam com mamaglobina e GCDFP15. GATA3 teve sensibilidade de 66% em carcinomas mamários com triplo-negativo, muito superiores à mamaglobina 26% e GCDFP15 16%¹³¹.

Liu et al. observaram que em carcinomas estrogênio-dependentes, o GATA3 teve sensibilidade de 69% em comparação com GCDFP15 15% e mamaglobina 35%¹³². Além da menor sensibilidade, GCDFP15 e mamaglobina

apresentam baixa especificidade e expressão observada igualmente em carcinomas de endométrio e melanomas, tudo isto revela o papel do GATA3 como um marcador de diagnóstico útil na prática¹³³.

Ao examinar derrame maligno de sítio primário desconhecido é importante atentar que GATA3 é multiespecífico e outros diagnósticos diferenciais devem ser aventados, como carcinomas de células escamosas pulmonares, laríngeas e ginecológicas. Clark et al. relataram que a proteína do gene GATA3 pode ser fracamente expressa em 18% dos carcinomas endocervicais, 7% dos endometriais e 10% dos ovarianos. Os carcinomas ginecológicos de células escamosas da vulva e do colo uterino podem ser positivos para GATA3, com uma sensibilidade geral de 60%¹³⁴. A proteína do gene GATA3 também pode ser expressa em todos os tumores anexais da pele, carcinomas uroteliais e tumores de glândulas salivares^{18,126}. Nos colangiocarcinomas, tumores pancreáticos e gástricos, a expressão é baixa, presente em apenas cerca de 10% dos casos¹³⁴.

Deve-se também, ter em mente, que os mesoteliomas podem expressar o GATA3 em 58% dos casos. Desta forma, é necessária a inclusão de um *pool* de outros marcadores imuno-histoquímicos úteis na investigação de outros sítios primários, como o PAX8, útil para excluir a origem mülleriana, calretinina para excluir mesotelioma, p63, p40 e CK5/6 para excluir carcinomas de células escamosas e uroteliais e TTF-1 e napsina para excluir adenocarcinomas pulmonares^{135,136}.

Importante salientar o diagnóstico diferencial com carcinoma urotelial e mesotelioma, pois GATA3 pode ser positivo em ambos. Deve-se excluir o carcinoma urotelial com base em suas características morfológicas e imuno-

histoquímicas nos derrames. Os carcinomas uroteliais raramente se manifestam em efusões serosas e geralmente em um estágio muito tardio da doença. Apresenta-se como aglomerados celulares ou células únicas com alta relação citoplasmática nuclear, núcleos hipercromáticos com membranas nucleares irregulares¹³⁷.

A expressão de GATA3 em doença metastática da mama foi avaliada em seis estudos, que incluíram de 30 a 166 casos envolvendo vários sítios, incluindo SNC, ossos, trato gastrointestinal, trato ginecológico, fígado, pulmões e outros. GATA3 foi positivo em 73% a 95% nos estudos. Quando separados por *status* RE, 56% dos tumores de mama metastáticos triplo-negativos e 100% dos RE positivos/HER2 negativos e 100% dos tumores RE negativos/HER2 positivos apresentaram coloração para GATA3, sugerindo que em alguns tipos de carcinomas, a expressão de GATA3 está dissociada da sinalização de RE¹³.

A maioria dos tumores ovarianos, endometriais e endocervicais não expressam GATA3, apesar de alguns tipos pouco usuais de adenocarcinomas endocervicais e adenocarcinomas endometriais poderem ser fracamente positivos¹³⁸.

Os marcadores PAX8 e NY-BR-1 podem ser úteis na diferenciação dessas duas origens, principalmente quando há possibilidade de metástase para a mama do trato ginecológico e vice-versa¹³⁴. Expressão moderada ou alta do GATA3 associada a PAX8 negativo sugere fortemente a origem mamária, enquanto o contrário seria sugestivo de origem ginecológica. As exceções seriam o tumor de Brenner e tumor de células transicionais do ovário, que foram avaliados quanto à expressão de GATA3 por Esheba et al. Os autores identificaram expressão de GATA3 em 96% dos casos¹³⁹.

No cenário de câncer de mama metastático, a identificação do sítio primário pode ser um desafio diante de tumores triplo-negativos ou de tumores que perderam seus marcadores iniciais. O marcador SOX10 vem sendo estudado como um possível marcador de tumores RE negativos. Tozbikian et al. avaliaram a utilidade diagnóstica do painel SOX10, GATA3 e RA em carcinomas metastáticos de mama que são negativos para RE, RP e HER2 e compararam a expressão dos mesmos marcadores em tumores primários de mama não metastático e identificaram que SOX10 e GATA3 são complementares, apesar do GATA3 ser mais sensível de forma geral, o SOX10 tem relevância por expressar-se em um percentual de tumores GATA3 negativos¹¹⁸.

3.8. GATA3 e prognóstico do câncer de mama

O valor prognóstico da expressão do gene GATA3 vem sendo foco de diversos estudos, uma vez que parece apresentar valor independente da expressão de receptores hormonais.

Yu et al. avaliaram o prognóstico de pacientes portadoras de tumores de mama triplo-negativos com doença residual após quimioterapia neoadjuvante e observaram que as pacientes que apresentaram tumores com maior expressão de genes *luminal-like* (RA e GATA3) tiveram melhor prognóstico. Apesar de a expressão de GATA3 estar classicamente associada à de receptor de estrogênio, cerca de 30-40% dos tumores triplo-negativos apresentam alta ou moderada expressão de GATA3. A baixa expressão de GATA3 está associada a fenótipo mais agressivo e, em muitos estudos, o pior prognóstico¹⁴⁰.

Cada vez mais evidências mostram que o papel do GATA3 não é exclusivamente dependente de RE e que GATA3 é funcionante nos tumores triplo-negativos. Além disso, a expressão de GATA3 reprograma essas células para um fenótipo menos agressivo¹⁴¹.

Yoon et al. estudaram 86 casos de pacientes portadoras de carcinoma invasivo de mama — independente do *status* RE e do *status* axilar —, correlacionando a expressão de GATA3 à sobrevida. Também identificaram que pacientes com maior expressão de GATA3 tiveram 97% de sobrevida livre de doença em 10 anos e comparado com 72% nas pacientes com baixa expressão de GATA3²⁶.

Guo et al. reuniram os principais artigos a respeito em metanálise, com objetivo de identificar o valor prognóstico do gene GATA3. Concluíram que maior expressão de GATA3 está associada a maior tempo para progressão tumoral¹⁴². No entanto, a heterogeneidade entre os estudos deve ser levada em consideração, na avaliação de RNAm ou na expressão imuno-histoquímica, bem como o valor de *cut-off* utilizado nestas avaliações¹⁴².

Lin et al. identificaram que a maior expressão de RNAm de GATA3 foi relacionada a maior sobrevida livre de recorrência em todos os pacientes com câncer de mama¹⁴³.

Figura 1. Modelo estrutural do gene GATA3. **A.** Destaque para os dois domínios de ativação transcricional e dois dedos de zinco. **B.** Modelo associado à estrutura de éxons e principais mutações identificadas no GATA3 nos tumores de mama luminais A e B, apresentado por Takaku et al.⁵⁴.

Figura 2. Modelo estrutural ilustrando a interação de fatores de transcrição em dedo de zinco com a dupla hélice do DNA, baseado em Lodish et al.²⁰.

4.1. Modelo de estudo

Foi feito um estudo prospectivo de observação de série de casos, com amostra de conveniência. As pacientes foram atendidas em Serviço especializado em Mastologia (Clínica Prof. Alfredo Barros, em São Paulo).

4.2. Aspectos éticos

O protocolo da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE: 56269416.0.0000.0065/Número do parecer: 1.604.792). O estudo cumpre os preceitos éticos, como proposto pela legislação vigente da Resolução 466/2012.

A coleta de termo de consentimento livre e esclarecido por parte das pacientes foi dispensada, visto que não foi realizado nenhum procedimento que modificasse a rotina/tratamento do participante da pesquisa, e consequentemente, sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos. Adicionalmente, este estudo empregou apenas informações de prontuários médicos, todos manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos participantes de pesquisa.

4.3. Seleção de pacientes

Dados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos foram obtidos de pacientes tratadas nos anos de 2015 a 2019, com diagnóstico de CM.

A seleção de pacientes obedeceu aos critérios abaixo discriminados:

Crítérios de inclusão: sexo feminino, carcinoma invasivo de mama.

Crítérios de exclusão: terapia sistêmica neoadjuvante e formas metastáticas (estadio IV).

4.4. Análise histopatológica e imuno-histoquímica

Todas as análises foram feitas em espécimes obtidos em peças cirúrgicas. Amostras de tecido tumoral fixado em formol tamponado e incluído em parafina foram seccionadas por microtomia manual e coradas por hematoxilina e eosina (HE) para exame microscópico.

Houve elaboração de mapas de orientação e as lâminas foram separadas conforme o mapa, numeradas e reservadas em estufa à 60°C para fixação durante 90 a 120 minutos, o que garantiu a aderência dos cortes nas lâminas.

As lâminas foram colocadas em banho próprio na máquina PTLINK (Dako), conforme padronização do mesmo, variando entre pH baixo e pH alto, por 20, 30, 40 ou 50 minutos, sendo realizada a desparafinização e recuperação antigênica simultaneamente.

Para o marcador RE, foi utilizado tampão com pH alto e tempo de recuperação antigênica de 40 minutos. Para o RP, foi utilizado tampão com pH alto e tempo de recuperação de 30 minutos. Para o marcador RA, foi utilizado tampão com pH alto, o tempo de recuperação antigênica foi de 20 minutos.

Para o marcador GATA3, foi utilizado tampão com pH alto, com tempo de recuperação antigênica de 20 minutos. Para o Ki67, foi utilizado tampão com pH baixo, o tempo de recuperação antigênica foi de 20 minutos. Para o

marcador HER2, foi utilizado tampão com pH baixo, tempo de recuperação antigênica foi de 40 minutos.

O sistema de detecção utilizado para todos os marcadores foi o EnVision FLEX (Dako). A revelação da imuno-histoquímica para esses marcadores foi feita com diaminobenzidine diluído em Substrate Buffer (DAKO). Como contra coloração, foi utilizada hematoxilina de Mayer e depois colocados em água amoniacal por um minuto. Todas as lâminas de imuno-histoquímica passam por um processo de diafanização, depois recebem lamínula na sua montagem e posteriormente etiqueta de identificação. Os reagentes utilizados nas reações IMHs estão descritos da tabela 1.

Como parâmetros histopatológicos foram analisados os tipos histológicos tumorais atualizados segundo a classificação da OMS – 2019, tamanho tumoral, grau histológico (GH) segundo sistema de Nottingham, grau nuclear (GN), invasão vascular-linfática e estado linfonodal (pN)^{144,145}.

Os parâmetros imuno-histoquímicos pesquisados foram receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP), receptores de androgênio (RA) e *human epidermal growth fator receptor 2* (HER2).

Imunoexpressão em pelo menos 1% das células neoplásicas foi critério para positividade de RE, RP e RA, segundo recomendação atualizada da American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists⁸. A proteína do oncogene HER2 foi considerada como positiva diante da imunocoloração forte, uniforme e completa em toda a membrana celular em mais de 10% das células neoplásicas (escore 3+) por imuno-histoquímica (IHQ), ou 2+ com amplificação do gene por método molecular de hibridização *in situ*. O escore 2+ foi considerado como coloração incompleta da membrana e/ou coloração

fraca, moderada em mais de 10% das células tumorais ou coloração intensa da membrana em $\leq 10\%$ das células tumorais¹⁴⁶.

A expressão de GATA3 positiva nuclear foi avaliada em porcentagem de células coradas na área tumoral. Controle interno da reação foi a presença de ductulos e lóbulos mamários com expressão normal em células epiteliais (figura 3). Casos com distribuição heterogênea foram avaliados com contagem de pelo menos três áreas diferentes e calculada a média.

Para o Ki67, foram contadas pelo menos 500 células em três áreas distintas e calculada a média da porcentagem.

Para fazer analogia com os subtipos intrínsecos moleculares caracterizados por *microarray*, os CM foram subdivididos em quatro grupos, classificação por IHQ em: RE positivo/HER 2 negativo; RE positivo/HER 2 positivo; RE negativo/HER 2 positivo e RE negativo/HER 2 negativo.

O nível de *cut-off* para positividade de GATA3 foi consignado a partir da coloração em pelo menos 1% dos núcleos das células tumorais, a exemplo do que foi sugerido por Kim et al.⁹².

De acordo com a porcentagem de células neoplásicas coradas, a expressão de GATA3 por IMH foi classificada em:

- **Positiva rica:** coloração em 96% ou mais das células (figura 4);
- **Positiva intermediária:** coloração entre 21 e 95% das células (figura 5);
- **Positiva pobre:** coloração em até 20% das células (figura 6);
- **Negativa:** ausência de coloração ou presente em fraca intensidade em menos de 1% das células neoplásicas (figura 7);

Para efeito de análise estatística, a preservação da expressão de GATA3 nas células marcadas foi dividida em duas categorias:

- **Expressão preservada:** expressão positiva em intensidade forte em > 95% das células neoplásicas (positiva rica);
- **Expressão reduzida:** expressão positiva intermediária, pobre ou negativa.

Os graus de expressão de GATA3 foram comparados com os parâmetros morfológicos (tipo histológico, GH, GN, IVL e pN), imuno-histoquímicos (RE, RP, RA e HER 2) e subtipos tumorais com base em IMH.

4.5. Análise dos dados

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva por meio de proporções, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). No caso das variáveis quantitativas os valores de média, desvio padrão (DP), mediana, percentil 25 (P25) e 75 (P75) foram calculados.

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a hipótese de normalidade das variáveis quantitativas discretas ou contínuas. Para testar a hipótese de que as variáveis qualitativas tem distribuição semelhante entre indivíduos com e sem diminuição de GATA3, utilizou-se o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer quando necessário. Para as variáveis numéricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0.05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares IBM SPSS 25 (Statistical Package for the Social Sciences) e Excel 2016® (Microsoft Office).

Figura 3. Tecido mamário normal mostrando positividade nuclear para GATA3 em células epiteliais com forte intensidade. O padrão de expressão destas estruturas foi usado como controle interno da reação na neoplasia (40X).

Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de GATA3 em 100% das células de carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial evidenciando-se coloração nuclear forte e difusa. Este padrão de coloração foi considerado como expressão positiva rica de GATA3 (100X).

Figura 5. Expressão imuno-histoquímica de GATA3 em 40% das células de carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial. Este padrão de coloração foi considerado como expressão positiva intermediária de GATA3 (100X).

Figura 6. Expressão imuno-histoquímica de GATA3 em 20% das células de carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial. Este padrão de coloração foi considerado como expressão positiva pobre de GATA3 (100X).

Figura 7. Expressão imuno-histoquímica de GATA3 negativa em carcinoma mamário infiltrativo de tipo histológico não especial (100X).

Tabela 1. Características dos marcadores utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

Marcador	Clone do anticorpo	Fonte do anticorpo	Diluição	Recuperação antigênica
RE	EP1 (Dako Agilent)	Coelho	1:1000	40 min/pH alto
RP	PgR 636 (Dako)	Rato	1:500	30 min/pH alto
RA	SP107 (Cellmarque)	Coelho	1:100	20 min/pH alto
HER2	SP3 (Cellmarque)	Coelho	1:300	40 min/pH baixo
Ki67	Mib-1 (Dako Agilent)	Rato	1:500	20 min/pH baixo
GATA3	L 50-823 (Cellmarque)	Rato	1:1000	20 min/pH alto

5.1. Características clínico-patológicas

No período estudado foram operadas 120 pacientes com CM invasivo não metastático, nas quais, em 105 (87,5%) o painel imuno-histoquímico da peça cirúrgica incluiu a pesquisa da expressão de GATA3. Estas 105 pacientes efetivamente constituíram a população estudada. As características clínico-patológicas estão reunidas na tabela 2.

A média de idade das pacientes foi de 57,3 anos ($\pm$ 12,9 anos). Quanto ao estado menopausal, 38 (36,2%) estavam na pré-menopausa e 67 (63,8%) na pós-menopausa.

Clinicamente as pacientes foram classificadas antes da cirurgia conforme o tamanho tumoral em: T1 - 59 (56,2%), T2 - 35 (33,3%), T3 - 11 (10,5%).

O tratamento cirúrgico realizado foi mastectomia em 26 (24,8%), adenectomia mamária em 24 (22,8%) e ressecção segmentar de mama em 55 (52,4%).

Após tempo de seguimento mediano de 22 meses (8-36), todas as pacientes apresentavam-se vivas e sem sinais de doença neoplásica, tanto em âmbito locorregional, como sistêmico.

5.2. Achados histopatológicos

Em termos de subtipo histopatológico, foram 75 (71,4%) carcinomas invasivos tipo não especial, 14 (13,3%) carcinomas lobulares infiltrativos e 16 (15,3%) carcinomas de outros subtipos.

Os tamanhos tumorais relatados nos exames microscópicos finais foram pT1 ($T \leq 2,0\text{cm}$) em 63 (60%), pT2 ($2,0\text{ cm} < T \leq 5,0\text{ cm}$) em 35 (33,3%) e pT3 ($T > 5,0\text{ cm}$) em 7 (6,7%).

Quanto ao grau histológico, 17 (16,2%) apresentavam grau I, 61 (58,1%) eram grau II, e 27 (25,7%) eram grau III. Um total de 13 (12,4%) correspondia a grau nuclear 1, 46 (43,8%) a grau nuclear 2 e 46 (43,8%) a grau nuclear 3.

Setenta e três tumores não apresentaram invasão vascular linfática peritumoral (69,5%), 19 apresentaram invasão focal (18,1%) e em 13 a invasão era extensa ou multifocal (12,4%).

Em 69 casos não se detectou comprometimento linfonodal axilar (65,7%) no exame anatomopatológico pós-operatório, ao passo que em 36 foi observado pelo menos um linfonodo afetado (34,3%).

5.3. Dados imuno-histoquímicos e classificação em subtipos moleculares

A tabela 3 ilustra as verificações imuno-histoquímicas de RE, RP, RA, HER2 e Ki67 no total da amostra.

A classificação em subtipos baseada nos achados de IMH está apresentada na tabela 4.

5.4. Expressão de GATA3 nas células tumorais

Nos 105 casos analisados, a expressão de GATA3 esteve positiva em 103 (98,1%) e negativa em 2 (1,9%). A expressão de GATA3, de acordo com a proporção de células coradas, foi observada da seguinte forma: expressão rica (96% ou mais), sendo a mais comum, e ocorreu em 80% dos indivíduos, seguida

da expressão intermediária (21 - 95%), que ocorreu em 17,1%, expressão pobre (1% a 20%) que ocorreu em 1,0%, e a negativa em 1,9%. A figura 8 ilustra a frequência de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

As figuras 4, 5, 6 e 7 ilustram lâminas microscópicas com reação IMH de acordo com a proporção de células coradas. Na figura 3 demonstra-se positividade da proteína pesquisada em células epiteliais normais, usada como controle interno da reação IMH.

5.5. Relação entre a expressão de GATA3 e parâmetros morfológicos

Nos diversos subtipos histológicos a expressão de GATA3 esteve preservada na maioria das vezes, sendo que na histologia lobular estava preservada em 100% dos casos. Nos tumores com histologia não especial (SOE), a expressão de GATA3 esteve preservada em 77,3%, nos outros tipos histológicos esteve preservada em 75%. Estes dados podem ser vistos na tabela 5.

A expressão de GATA3, categorizada pela proporção de células coradas conforme os subtipos histológicos, está listada na tabela 6. Apenas os carcinomas invasivos subtipo não especial (SOE) apresentaram resultados negativos e/ou pobres, 3 casos (4%).

Os casos rotulados com GH II e GH III, e aqueles com GN 2 e GN 3, apresentaram preservação de GATA3 com diferença significativa em relação à redução. O GH II foi mais frequente em tumores com a expressão de GATA3 preservada, já o GH III esteve mais presente em tumores com a expressão de GATA3 reduzida. Quanto ao GN, tanto o GN 2 como o GN 3 foram mais presentes em tumores com expressão de GATA3 preservada. Nos parâmetros

IVL, pT e pN não foram verificadas diferenças significantes. Todos estes achados aparecem detalhados na tabela 7.

A tabela 8 discrimina a associação dos parâmetros histopatológicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

5.6. Relação entre expressão de GATA3 e parâmetros imuno-histoquímicos

Ficou consignada grande predominância de preservação de GATA3 em RE positivos (92,8% *versus* 7,1%) ($P < 0,001$), em RP positivos (94,4% *versus* 5,6%) ($P < 0,001$) e em RA positivos (88,4% *versus* 11,6%) ($P < 0,001$). Esses dados podem ser observados na tabela 9. Quanto ao oncogene HER2 houve predominância de preservação de GATA3 diante de HER2 negativo (85,1% *versus* 14,9%).

Os resultados de expressão de GATA3 por proporção de células coradas são observados na tabela 10, com informações semelhantes às da tabela anterior, porém de forma estratificada por grupos.

Com relação ao Ki67, em todas as estatísticas avaliadas os valores no grupo com redução são maiores (média: 51,4, desvio padrão: 26,8, mediana: 47,5, percentil 25: 25,0 e percentil 75: 75,0) em relação ao grupo com expressão de GATA3 preservada (média: 21,5, desvio padrão: 12,1, mediana: 20,0, percentil 25: 10,0 e percentil 75: 30,0); nota-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os grupos para essa variável (tabela 10). No gráfico 1 é possível perceber essa diferença.

5.7. Relação entre a expressão de GATA3 e os subtipos imuno-histoquímicos

A relação entre GATA3 e os subtipos classificados por IMH surge discriminada nas tabelas 12 e 13. Constatou-se que nos tumores RE positivos/HER2 negativos a expressão de GATA3 esteve mais frequentemente preservada (93,2% *versus* 6,7%) ($P < 0.001$). Já nos tumores RE negativos/HER2 positivos e RE negativos/HER2 negativos a expressão de GATA3 esteve mais frequentemente reduzida ($P = 0,001$).

A tabela 14 mostra a associação da expressão de receptores de androgênio com a expressão de GATA3 no subtipo receptor de estrogênio negativo/HER2 negativo.

O quadro 1 apresenta uma matriz de dispersão baseada em gráficos relacionando as variáveis GATA3, RE e Ki67. Nessa análise pode-se perceber covariações significantes em duas das avaliações: a expressão de GATA3 foi diretamente proporcional com a expressão de RE, com coeficiente de correção de magnitude de 0,231 e com significância estatística ($P = 0,033$) e, um pouco mais forte, mas inversamente proporcional ao valor de Ki67, com coeficiente de correção de -0,469, e com significância estatística ($P < 0,001$).

Tabela 2. Características clínico-patológicas da casuística total.

	N	(%)
Idade (Anos)	57 ($\pm$ 12.9)	---
Estado menopausal		
Pós-menopausa	67	(63,8)
Pré-menopausa	38	(36,2)
Subtipo histopatológico		
Não especial	75	(71,4)
Lobular	14	(13,3)
Outros	16	(15,3)
Tamanho do tumor (Clínico)		
cT1	59	(56,2)
cT2	35	(33,3)
cT3	11	(10,5)
Tamanho do tumor (AP)		
pT1	63	(60)
pT2	35	(33,3)
pT3	7	(6,7)
Grau histológico		
I	17	(16,2)
II	61	(58,1)
III	27	(25,7)
Grau nuclear		
1	13	(12,4)
2	46	(43,8)
3	46	(43,8)
Invasão vásculo-linfática		
Ausente	73	(69,5)
Focal	19	(18,1)
Multifocal	13	(12,4)
Comprometimento linfonodal axilar		
pN0	69	(65,7)
pN1	36	(34,3)
Subtipos imuno-histoquímicos		
RE positivo/HER2 negativo	74	(70,5)
RE positivo/HER2 positivo	10	(9,5)
RE negativo/HER2 positivo	8	(7,6)
RE negativo/HER2 negativo	13	(12,4)

RE: Receptor de estrogênio

Tabela 3. Parâmetros imuno-histoquímicos pesquisados na casuística total.

		N	(%)
RE	Positivo	84	(80)
	Negativo	21	(20)
RP	Positivo	72	(68,6)
	Negativo	33	(31,4)
RA*	Positivo	86	(82,7)
	Negativo	18	(17,3)
HER2	Positivo	18	(17,1)
	Negativo	87	(82,9)
Ki67	≤ 20%	47	(44,8)
	> 20%	58	(55,2)

RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; RA = receptor de androgênio; *1 valor faltante.

Tabela 4. Classificação em subtipos imuno-histoquímicos dos tumores na casuística total.

	N	(%)
RE positivo/HER2 negativo	74	(70,5)
RE positivo/HER2 positivo	10	(9,5)
RE negativo/HER2 positivo	8	(7,6)
RE negativo/HER2 negativo	13	(12,4)

RE = receptor de estrogênio.

Tabela 5. Associação dos subtipos histológicos e preservação ou redução de GATA3.

	Redução		Preservação		P
	N	(%)	N	(%)	
Invasivo (SOE)	17	(22,7)	58	(77,3)	0,204
Lobular	0	-	14	(100)	0,295
Outros	4	(25)	12	(75)	> 0,999

Tabela 6. Associação dos subtipos histológicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

	Negativa		Pobre		Intermediária		Rica		P
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Invasivo (SOE)	2	(2,7)	1	(1,3)	14	(18,7)	58	(77,3)	0,510
Lobular	0	-	0	-	0	-	14	(100)	0,549
Outros	0	-	0	-	4	(25)	12	(75)	0,905

Tabela 7. Associação dos dados dos parâmetros histopatológicos e expressão de GATA3.

	Redução		Preservação		P
	N	(%)	N	(%)	
GH					
I	2	(11,8)	15	(88,2)	0,351
II	4	(6,6)	57	(93,4)	< 0,001
III	15	(55,6)	12	44,4	< 0,001
GN					
1	2	(15,4)	11	(84,6)	0,729
2	2	(4,3)	44	(95,7)	0,001
3	17	(36,9)	29	(63,4%)	< 0,001
IVL					
Ausente	15	(20,5)	58	(79,5)	0,605
Focal	5	(26,3)	14	(73,7)	0,607
Multifocal	1	(7,7)	12	(92,3)	0,289
pT					
≤ 20mm	12	(19,1)	51	(80,9)	0,923
> 20 mm e ≤ 50 mm	9	(25,7)	26	(74,3)	0,505
> 50 mm	0	(0,0)	7	(100,0)	0,343
pN					
Positivo	5	(13,8)	31	(86,1)	0,349
Negativo	16	(23,2)	53	(76,8)	0,349

GH = grau histológico; GN = grau nuclear; IVL = invasão vasculo-linfática; pT = tamanho do tumor invasivo no espécime cirúrgico; pN = *status* axilar no espécime cirúrgico.

Tabela 8. Associação entre parâmetros histopatológicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

	Negativa		Pobre		Intermediária		Rica		P
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
GH									
I	0	-	0	-	2	(11,8)	15	(88,2)	0,703
II	0	-	0	-	4	(6,5)	57	(90,2)	0,004
III	2	(7,4)	1	(3,7)	12	(44,4)	12	(44,4)	< 0,001
GN									
1	0	-	0	-	2	(15,4)	11	(84,6)	0,894
2	0	-	0	-	2	(4,3)	44	(95,7)	0,009
3	2	(4,3)	1	(2,2)	14	(30,4)	29	(63,1)	0,002
IVL									
Ausente	1	(1,4)	1	(1,4)	13	(17,8)	58	(79,4)	0,767
Focal	1	(5,3)	0	-	4	(21,1)	14	(73,7)	0,637
Multifocal	0	-	0	-	1	(7,7)	12	(92,3)	0,612
pT									
≤ 20mm	2	(3,2)	1	(1,6)	9	(14,3)	51	(80,9)	0,530
> 20 mm e ≤ 50 mm	0	-	0	-	9	(25,7)	26	(74,3)	0,420
> 50 mm	0	-	0	-	0	-	7	(100,0)	0,551
pN									
Positivo	0	-	0	-	5	(13,8)	31	(86,1)	0,589
Negativo	2	(2,9)	1	(1,4)	13	(18,8)	53	(76,8)	0,589

GH = grau histológico; GN = grau nuclear; IVL = invasão vasculo-linfática; pT = tamanho do tumor invasivo no espécime cirúrgico; pN = *status* axilar no espécime cirúrgico.

Tabela 9. Associação entre parâmetros imuno-histoquímicos e preservação ou redução da expressão de GATA3.

	Redução		Preservação		P
	N	(%)	N	(%)	
RE					
Positivo	6	(7,1)	78	(92,8)	< 0,001
Negativo	15	(71,4)	6	(28,6)	< 0,001
RP					
Positivo	4	(5,6)	68	(94,4)	< 0,001
Negativo	17	(51,5)	16	(48,5)	< 0,001
RA*					
Positivo	10	(11,6)	76	(88,4)	< 0,001
Negativo	11	(61,1)	7	(38,9)	< 0,001
HER2					
Superexpresso	8	(44,4)	10	(55,6)	0,011
Negativo	13	(14,9)	74	(85,1)	0,011
Ki67					
≤ 20%	4	(8,5)	43	(91,5)	0,017
> 20%	17	(29,3)	41	(70,7)	0,017

RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; RA = receptor de androgênio; *1 valor faltante.

Tabela 10. Associação entre parâmetros imuno-histoquímicos e expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

	Negativa		Pobre		Intermediária		Rica		P
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
RE									
Positivo	0	-	0	-	5	(6,0)	78	(94,0)	< 0,001
Negativo	2	(9,1)	1	(4,5)	13	(59,1)	6	(27,3)	< 0,001
RP									
Positivo	0	-	0	-	4	(5,6)	68	(94,4)	< 0,001
Negativo	2	(6,0)	1	(3,0)	14	(42,4)	16	(48,5)	< 0,001
RA*									
Positivo	0	-	0	-	10	(11,6)	76	(88,3)	< 0,001
Negativo	2	(11,1)	1	(5,6)	8	(44,4)	7	(38,9)	< 0,001
HER2									
Superexpresso	1	(5,6)	0	-	7	(38,9)	10	(55,6)	0,054
Negativo	1	(1,1)	1	(1,1)	11	(12,6)	74	(85,1)	0,054
Ki67									
≤ 20%	0	-	0	-	4	(8,5)	43	(91,5)	0,073
> 20%	2	(3,4)	1	(1,7)	14	(24,1)	41	(70,7)	0,073

RE = receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; RA = receptor de androgênio; *1 valor faltante.

Tabela 11. Análise descritiva das variáveis quantitativas entre os indivíduos com e sem redução de GATA3.

	Com redução					Sem redução					P
	Média	DP	Mediana	P25	P75	Média	DP	Mediana	P25	P75	
Idade	55	16	50	46	67	58	12	60	49	66	0,171
Nº de nódulos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,709
TCM (mm)	18	11	18	11	22	23	19	17	10	30	0,678
RE (%)	63,6	44,5	95,0	15,0	100,0	96,1	12,2	100,0	95,0	100,0	0,037
RP (%)	46,0	46,8	35,0	5,0	90,0	72,5	31,4	85,0	50,0	100,0	0,198
HER2	1	1	0	0	3	1	1	0	0	1	0,158
Ki67	51,4	26,8	47,5	25,0	75,0	21,5	12,1	20,0	10,0	30,0	< 0,001

TCM = Tamanho do componente invasivo (mm). P25 = 25% dos dados são valores menores ou iguais ao valor do percentil cinquenta. P75 = 75% dos dados são valores menores ou iguais ao valor do primeiro percentil.

Tabela 12. Associação dos subtipos moleculares imuno-histoquímicos com a preservação ou redução da expressão de GATA3.

	Redução		Preservação		P
	N	(%)	N	(%)	
RE positivo/HER2 negativo	5	(6,7)	69	(93,2)	< 0.001
RE positivo/HER2 positivo	2	(20,0)	8	(80,0)	> 0.999
RE negativo/HER2 positivo	6	(75,0)	2	(25,0)	0.001
RE negativo/HER2 negativo	10	(76,9)	3	(23,1)	< 0.001

RE = receptor de estrogênio

Tabela 13. Associação dos subtipos imuno-histoquímicos e a expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

	Negativa		Pobre		Intermediária		Rica		P
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
RE positivo/HER2 negativo	0	-	0	-	5	(6,8)	69	(93,2)	< 0,001
RE positivo/HER2 positivo	0	-	0	-	2	(20,0)	8	(80,0)	0,955
RE negativo/HER2 positivo	1	(12,5)	0	-	5	(62,5)	2	(25,0)	0,001
RE negativo/HER2 negativo	1	(7,7)	1	(7,7)	8	(61,5)	3	(23,1)	< 0,001

RE = receptor de estrogênio

Tabela 14. Associação da expressão de receptores de androgênio com a expressão de GATA3 no subtipo receptor de estrogênio negativo/HER2 negativo.

	Redução		Preservação		P
	N	(%)	N	(%)	
RA Positivo	3	50%	3	50%	0,652
RA Negativo	7	100%	0	0	0,069

RA = receptor de androgênio

Figura 8. Frequência da expressão de GATA3 baseada na proporção de células coradas.

Gráfico 1. Distribuição das medianas dos valores de Ki67 entre os grupos com e sem redução de GATA3.

Quadro 1. Matriz de dispersão da expressão de GATA3, de Ki67 e de RE baseada em gráficos.

O capítulo da participação dos fatores de transcrição no âmbito hormonal do CM tem logrado interesse crescente, tanto em termos fisiopatológicos, como em termos de aplicação prática. Entre os mais importantes e mais pesquisados está o gene GATA3.

Historicamente, o transcrito GATA foi descrito pioneiramente em 1989, por Evans e Felsenfeld, no desenvolvimento de eritrócitos¹⁴⁷. Denominaram-no de *erythroid-specific transcription factor* (Eryf1), ligante do DNA em galináceos. Em seguida, em 1991, Ho e col. identificaram papel deste fator transcrito na ativação de receptor de células T⁵⁶. Mais tarde, o fator foi re-denominado como GATA, devido à ligação com a sequência A/T GATA A/C do DNA, e foram-lhe acrescentadas novas funções codificadoras^{148,149}. Foi visto, também, seu envolvimento na diferenciação do tecido epitelial glandular mamário¹⁷.

Devido ao papel do GATA3 para manter a diferenciação e adesão intercelular nas células glandulares mamárias, foi postulado que sua perda de função estivesse relacionada com a patogênese do CM. Em 1999, Hoch et al.⁸² viram correlação entre expressões dos genes GATA3 e gene ESR1 (*estrogen receptor alpha gene*). E em 2000, Perou e col. evidenciaram, por estudos de *microarray*, que o gene GATA3 aparecia frequentemente altamente expresso no CM.⁴

Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA e viabilizam o processo transcrito, sendo, portanto, o primeiro passo para a expressão de determinado gene. Com a ligação do fator de transcrição à sequência do DNA, a RNA polimerase II é atraída e inicia-se o pareamento via códons e a produção do RNA mensageiro. Posteriormente, com a participação

do RNA transportador (anticódon), será codificada a síntese de uma proteína mediante a incorporação específica de aminoácidos.

O processo de transcrição é baseado na complementaridade de bases. A síntese de RNA ocorre dentro da chamada bolha de transcrição, uma estrutura na qual cerca de 18 pares de bases de DNA são temporariamente separados e uma das fitas da dupla hélice serve como molde para o RNA que está se formando. À medida que a polimerase do RNA se move, a bolha de transcrição desloca-se com ela, e a cadeia de RNA aumenta em tamanho. Após a passagem da polimerase, a estrutura de RNA se solta de seu molde e as duas cadeias do DNA voltam a se emparelhar, restabelecendo as pontes de hidrogênio rompidas durante a transcrição. Os fatores de transcrição atuam atraindo a RNA polimerase II e posicionando-a no local correto onde deve ocorrer o início da transcrição¹⁵⁰.

Um fator de transcrição pode não somente ativar, como também reprimir a transcrição de um determinado gene, permitindo ou bloqueando o acesso da RNA polimerase ao promotor. Alguns fatores de transcrição funcionam apenas como ativadores (aumentando a afinidade da RNA polimerase pelo promotor) ou como repressores (diminuindo a afinidade da RNA polimerase pelo promotor), ou até mesmo funcionar como ambos, de acordo com o promotor-alvo¹⁵¹.

A interação entre as proteínas reguladoras e o DNA é fundamental para a transcrição, em processo coordenado por múltiplos fatores, inclusive ambientais^{152,153}.

Os fatores de transcrição GATA são proteínas em dedo de zinco que se ligam ao DNA e tem importante papel na diferenciação de diversos tecidos, inclusive da glândula mamária. GATA3 participa na diferenciação de células epiteliais mamárias e no desenvolvimento do tecido mamário normal¹⁷.

Os fatores de transcrição não atuam sozinhos, criam redes de regulação gênica complexas, que ajustam a expressão dos genes para atender às demandas fisiológicas. A quebra dessas vias regulatórias está associada com doenças como câncer.

RE-alfa, FOXA1 e GATA3 são fatores de transcrição essenciais no desenvolvimento de células mamárias e foram implicados no CM^{59,154}. A alta expressão desses três fatores de transcrição é característica de tumores dos subtipos luminais. Usary et al. observaram mutações frequentes nos genes GATA3 e FOXA1 nos tumores de mama⁸⁶. Mais de 10% dos tumores de mama carregam mutações somáticas no gene GATA3 e essas mutações são mais frequentemente observadas nos carcinomas invasivos não especiais (SOE). Em contraposição, as mutações FOXA1 parecem ser mais frequentemente detectadas no subtipo lobular (em cerca de 7%)^{30,75}.

Takaku et al. demonstraram que mutação no GATA3 é capaz de interromper e reformular a localização do RE-alfa e FOXA1⁶⁹. Os autores sugerem que a redistribuição de RE-alfa e FOXA1 está associada à mudanças na arquitetura da cromatina e à expressão gênica. Diminuição da ligação de RE-alfa, FOXA1 e GATA3 foi predominantemente observada nos *loci* onde os três fatores estão colocalizados⁶⁹.

A proteína do gene GATA3 é frequentemente expressa no câncer de mama, portanto, a sua avaliação imuno-histoquímica é indicada no

reconhecimento de sítio primário mamário na pesquisa de neoplasias de origem desconhecida¹⁵⁵.

Um resultado que se evidenciou em nossa casuística, foi que a proteína GATA3 esteve expressa na quase totalidade dos casos (98,1%), considerando-se a positividade para um *cut off* de pelo menos 1% de células tumorais coradas. Esta cifra é bastante elevada, uma das maiores referidas na literatura, que já constatou até 100% de positividade^{112,123,133,156}. Diferenças neste particular podem ser atribuídas à heterogeneidade das casuísticas (porcentagem de RE positivos ou triplo-negativos, por exemplo), à metodologia dos marcadores imuno-histoquímicos, ao ponto de corte para considerar positividade de GATA3 e à frequência dos diversos subtipos morfológicos. Certos autores^{18,123,133,157} consideram que com menos de 5% dos núcleos celulares corados, deveria ser o tumor classificado como GATA3 negativo; sucede que, em nossa casuística, mesmo se colocássemos o limite de 5%, a taxa de positividade seria a mesma; outrossim, se elevássemos até 20% para critério de negatividade (incluindo-se os casos catalogados como positivos pobres), incluiríamos apenas um caso a mais como negativo, ou seja, a positividade seria também muito alta (97,1%).

Os únicos casos de tumores GATA3 negativos foram provenientes de duas pacientes com idade de 30 e 50 anos, ambas com tumores triplo-negativos (RE negativo/RP negativo/HER2 negativo) e de alto grau. Na nossa amostra, pacientes com expressão reduzida de GATA3 tenderam a apresentar idade mais jovem (mediana em anos: 50 x 60), apesar da diferença não atingir significância estatística, possivelmente devido ao tamanho da amostra.

Nossos dados ressaltam a importância prática do marcador GATA3 na definição de sítio primário de carcinomas ocultos de mama, descortinados em linfonodos regionais. Alguns estudos já compararam GATA3 com outros marcadores empregados com este desiderato, como mamoglobina e GCDFP-15, e revelaram a superioridade da sensibilidade da proteína GATA3^{158,159}. Cumpre ressaltar que o marcador não é específico para mama, marcando também tumores uroteliais. Ocasionalmente, GATA3 pode aparecer em cânceres gastrointestinais, ginecológicos, pulmonares e melanoma.²²

Em média, a literatura aponta que de 80 a 95% dos CM RE positivos são GATA3 positivos e apenas de 0 a 25% dos RE negativos são GATA3 positivos. Na nossa casuística, em RE positivos observamos mais de 90% de preservação de GATA3, índice que cai para ao redor de 30% nos RE negativos, de modo que mesmo nos RE negativos a presença de GATA3 é de certa utilidade para esclarecimento de carcinomas ocultos, com sensibilidade, nestes casos semelhantes a dos outros biomarcadores. Com efeito, Ni et al. parearam 254 casos de CM infiltrativo que tiveram metástases linfonodais, para avaliar a correspondência de GATA3 no tumor e na axila: notaram concordância de positividade/negatividade entre o tumor primário e os linfonodos em 223 casos (90,6%). Estas cifras foram de 66,1% para mamoglobina e de 81,5% para GCDFP-15. Houve discordância em 24 vezes para GATA3, 12 positivos no tumor primário e negativos nos linfonodos e 12 de forma inversa¹⁵⁸.

De Lara et al. demonstraram a positividade de GATA3 em 94% de focos metastáticos de CM¹⁶⁰. Este dado aponta que a pesquisa de GATA3 pode ser

igualmente útil no esclarecimento de sítios metastáticos à distância de origem indeterminada, como certos derrames cavitários neoplásicos.^{129,130,131}

Nos resultados ora apresentados a expressão de GATA3 foi constatada ao redor de 90% dos casos com receptores hormonais positivos no tumor (RE, RP ou RA). Apesar de tipicamente o fator transcritor esteja relacionado à regulação do gene codificador do RE e outros receptores hormonais, é digno de nota, que GATA3 foi expresso em 28,6% dos RE negativos, em 48,5% dos RP negativos e 38,9% dos RA negativos. Ainda com relação a parâmetros imuno-histoquímicos o GATA3 foi mais frequentemente expresso nos HER2 negativos (85,1% x 55,6%) e nas neoplasias de menor atividade proliferativa estimada pelo Ki67 (91,5% nos tumores com Ki baixo e 70,7% naqueles com Ki67 elevado).

Ni et al. relataram positividade de GATA3 em 95,7% dos tumores luminais *A-like*, 91,1% nos luminais *B-like*, 59,6% nos HER2 positivos e 38,1% nos triplo-negativos¹⁵⁷. Nossos dados foram semelhantes, variando da preservação em 93,2% dos RE positivos/ HER2 negativos, a 23,1% nos RE negativos/HER2 negativos. Lu et al. constataram negatividade de GATA3 em 24% dos luminais, 18% nos HER2 e 54% nos basais-like¹⁶¹.

Interessante, e com potencial de utilidade prática, foi a verificação de Kim e col., de que GATA3 se expressa em cerca de 25% das neoplasias triplo-negativas (70% nos carcinomas moleculares apócrinos com este perfil), mais uma vez evidenciando a presença de uma via de GATA3 independente da alça regulatória com RE⁹². Estes autores criaram um escore para GATA3 baseado na multiplicação da porcentagem de células coradas, pela intensidade de

coloração (0 - negativo, 1 - fraca, 2 - moderada, e 3 - forte). O escore de GATA3 médio para triplo-negativos RA positivos foi de 37,4, ao passo que para os RA negativos foi de 4,2 ($p \leq 0,001$).

Entre nossos 13 casos de tumores triplo-negativos (RE negativo/RP negativo/HER2 negativo), 10 apresentaram expressão de GATA3 reduzida e neste grupo, Ki67 variou de 30% a 95%. Os três casos com expressão de GATA3 preservada, os valores de Ki67 foram 45%, 10% e 18%. Enquanto todos os tumores triplo-negativos com GATA3 preservado foram RA positivos, apenas três GATA3 reduzidos expressaram RA, um deles com apenas 2% de células positivas. Estes resultados sugerem que, o subtipo LAR (Luminal Androgen Receptor) de tumores triplo-negativos, caracterizado por Ki67 baixo e apresentação clínico-patológica biologicamente menos agressiva, depende da integridade funcional de GATA3.

Analizamos 18 tumores HER positivos, 10 com RE positivos e 8 com RE negativos. Enquanto que GATA3 reduzido foi mais frequente em tumores RE negativos (75% x 20%), não foi observada diferença estatística na atividade proliferativa analisada pela expressão de Ki67 pode ser demonstrada (mediana de 34% e 35% em ambos os grupos). Isto sugere que o papel de GATA3 em carcinomas HER2 positivos pode ser diferente.

Um grupo controverso é o grupo com baixa expressão de RE, categorizado de acordo com as recomendações da ASCP/CAP 2020⁸. Essa categoria compartilha características clínico-patológicas com tumores RE negativos, sugerindo risco de subtratamento se os considerarmos como RE positivos¹⁶².

Nós identificamos apenas dois carcinomas com baixa expressão de RE, ambos com GATA3 reduzido, uma proporção mais próxima a tumores RE negativos que RE positivos.

Quanto aos subtipos morfológicos, em todos os casos de carcinoma lobular infiltrativo, tumor emblemático para estímulo hormonal esteroídico e para terapia endócrina, observamos preservação de GATA3. Shaoxian et al. verificaram dados semelhantes, 47 GATA3 positivos em 48 carcinomas lobulares infiltrativos clássicos, sendo que em uma única vez em que a expressão foi negativa, o perfil imuno-histoquímico era triplo-negativo, evento raro nesta forma de neoplasia mamária¹⁶³. Carcinomas invasivos não especiais (SOE) foram os únicos a apresentar resultados negativos, 2 em 75 (2,7%) ou positivos pobres, 1 em 75 (1,3%).

Nos carcinomas indiferenciados GH III, cerca de 55,6% dos casos apresentaram redução de GATA3 ($P < 0,001$). A propósito, Lu e col.¹⁵⁸ constataram negatividade de GATA3 em 28% dos GH III, 3,5% no GH II e 2% no GH I. Stolnicu et al. tiveram 57,8% de GATA3 negativos no GIII¹⁶⁴. Outros pesquisadores obtiveram achados similares^{163,165}.

As associações que encontramos entre a expressão reduzida de GATA3 e tumores de alto grau estão em acordo com a literatura^{161,165}. Apesar dos métodos de avaliação do GATA3 variarem em diferentes estudos, a perda da expressão é sempre associada com receptores hormonais negativos, altos valores de Ki67 e tumores de alto grau. Como esperado, essas características são associadas com pior prognóstico independente do subtipo molecular.

Fugiu ao escopo deste nosso estudo a avaliação da relação da expressão de GATA3 com o prognóstico do CM, mas vários trabalhos publicados enfocaram a questão.

Cakir et al. relataram sobrevida livre de doença em 5 anos de 87% e 82% para CM GATA3 positivo e negativo, respectivamente ($P=0,001$)¹⁶⁵. Para Yoon et al. a sobrevida específica ao CM em 10 anos foi de 97% GATA3 elevado e 72% para baixo ($P: 0,004$)²⁶.

Inúmeros outros estudos apontaram na mesma direção: GATA3 positivo associado com melhor prognóstico, mormente em tumores RE positivos^{89,143,166,167,168,169}.

Infelizmente sabe-se que aproximadamente 10 a 30% dos tumores de mama receptores hormonais positivos não respondem ao tratamento endócrino¹⁷⁰. Portanto, a positividade para RE não é uma garantia de resposta à terapia hormonal.

Dentre os mecanismos relacionados à resistência à endocrinoterapia pode-se citar perda do receptor de estrogênio, mutação de ESR1, mutação do receptor, desregulação de componentes intracelulares como ciclina D1, ativação de receptores de crescimento na membrana celular, ativação de vias alternativas de multiplicação celular, como a via PI3K-AKT-mTOR e ausência de RP¹⁷⁰.

A sinalização PI3K-AKT-mTOR é uma das vias mais ativas no câncer de mama e esta via desempenha um papel importante no crescimento, proliferação, sobrevivência e metabolismo celular. Mutações em genes

associados à via PI3K-mTOR são comuns em cânceres de mama RE-positivos. Em particular, a mutação PIK3CA ocorre em aproximadamente 20% -30% dos cânceres de mama. Mutações na via PI3K-mTOR podem levar à resistência do tumor a múltiplos agentes antitumorais, incluindo paclitaxel, tamoxifeno e trastuzumabe. Além disso, as vias PI3K e ER frequentemente desempenham um papel sinérgico na progressão câncer de mama¹⁷⁰.

Salienta-se cada vez mais promissora o papel da proteína GATA3 na previsão da resposta à hormonioterapia. Parikh et al. foram os primeiros, em 2005, a especular sobre o fato, ao comparar dois grupos com RE positivos, um com resistência à terapia hormonal e outro com sensibilidade. Usaram o *cut off* de 20% de GATA3 para definir positividade: 6/14 (43%) dos casos não-responsivos foram GATA3 negativos, enquanto que nenhum dos sensíveis apresentaram negatividade¹⁶⁶. Hoch et al. concluíram que GATA 3 não é parte integrante da via de resposta ao estradiol, no entanto, correlaciona-se com os RE e são preditores potenciais de resposta à hormonioterapia⁸².

A redução da expressão de GATA3 parece mesmo impactar na endocrinoterapia. As mutações deste gene podem colaborar com mecanismos de refratariedade à terapia hormonal por viabilizar sinalização RE intracelular alternativa, como sugerido por Lu et al¹⁶¹.

Uma boa possibilidade de aplicação prática da pesquisa de GATA3 no CM é a de predição de resposta favorável com hormonioterapia, em pacientes RE positivos, RP negativos e GATA3 positivos. O grau de eficiência da terapia endócrina em tumores RE positivos/RP negativos é tema controverso. Tahiri et

al. observaram que a perda de RP relaciona-se com alta atividade de enzima tirosino-quinases, especialmente em casos HER2 negativo¹⁷¹.

Liu et al. avaliaram a resposta à terapia endócrina em tumores RE positivo/RP negativo/HER2 negativo¹⁷⁰. Observaram que cerca de 20% desses tumores são classificados como subtipo não-luminal pelo PAM50. Os autores propuseram uma forma de identificar os subtipos não-luminais através de três marcadores imuno-histoquímicos, sendo considerados tumores RE positivo, RP negativo e HER2 negativo não-luminais aqueles que apresentassem expressão de GATA3 negativa, CK5 positiva e ou EGFR positiva. Os tumores do subtipo luminal-like apresentaram expressão de GATA3 positiva, independente de CK5 e EGFR. Os subtipos luminal-like se beneficiaram mais da terapia endócrina ($P < 0,001$). Estes dados consubstanciaram valiosa informação de caráter aplicado, nos RE positivos e RP e HER2 negativos, a expressão de GATA3 aumenta a chance de resposta à hormonioterapia, achado importante para adjuvância ou para tratamento antimetastático.

A efetividade da terapia hormonal ainda é controversa em casos RE positivos/ RP negativos, habitualmente gerando um dilema terapêutico, portanto a possibilidade de utilizar GATA3 como auxílio nas decisões parece atrativo.

Tivemos 8 casos de carcinomas RE positivo/RP negativo/HER2 negativo, em 2 (25%) deles com GATA3 reduzido e Ki67 70% e 80%. Ambos tinham também RA negativo. Esses dados sugerem que tumores RE positivo/RP negativo/HER2 negativo correspondem a um grupo heterogêneo e uma

decisão terapêutica pode ser facilitada com avaliação da expressão de GATA3, RA e atividade proliferativa.

Uma linha interessante de pesquisa para futuro é estudar a possibilidade de GATA3 ser útil para previsão de resposta à quimioterapia neoadjuvante. Poucas publicações existem a respeito, com resultados ainda considerados inconclusivos.

Tominaga et al. analisaram 130 casos que receberam quimioterapia neoadjuvante⁸⁴. Constataram resposta patológica completa em 22 (39%) dos 56 tumores GATA3 negativos e em 8 dos 74 positivos (11%), com diferença significativa ($P < 0,001$). Em análise univariada — negativo vs positivo — a OR para resposta completa foi de 5,3 (IC 95% 2,1-13,3); em análise multivariada a OR foi de 3,6 (IC 95% 1,1-11,6), como variável independente do RE. Estes autores vislumbraram capacidade da negatividade de GATA3 na recomendação de quimioterapia neoadjuvante em tumores RE positivos localmente avançados. Igualmente, assim, sinalizaram Jiang e col., para quem GATA3 positivos associam-se à quimioresistência, em pesquisa só com casos HER2 negativos¹⁷². Angulo et al., de forma indireta, consideraram efeito diverso, sendo que alto índice mitótico prediz resposta favorável à quimioterapia pré-cirurgia, mas que o *status* de GATA é indiferente na caracterização da alta taxa de proliferação¹⁷³.

Dentre os pontos positivos do nosso estudo, podemos citar a inclusão de pacientes não selecionadas, todas tratadas por única equipe composta por um cirurgião (ACSDB) e dois patologistas (FMC e FNA). Explorou o papel do GATA3 em diferentes subtipos tumorais e sua associação com fatores

prognósticos e preditivos. Tem algumas limitações devido à amostra pequena, particularmente no grupo de tumores RE negativos. Além disso, o seguimento curto ainda é insuficiente para análise prognóstica, principalmente pelo fato da amostra ser composta de carcinomas de mama iniciais.

No entanto, abre novos caminhos a serem explorados no papel do GATA3 na patogênese e evolução do câncer de mama, por exemplo, em subgrupos com baixa expressão de RE, RE positivo/RP negativo, HER2 positivo e triplo-negativos subtipo LAR. Os resultados apresentados nestes subgrupos são intrigantes para investigações subsequentes neste campo, com potencial impacto no manejo terapêutico.

O moderno capítulo dos fatores de transcrição no CM está na fronteira do conhecimento e é alvissareiro para a melhora da terapia personalizada de precisão. Afirmava Descartes que “assim como não é das raízes ou do tronco de uma árvore que se colhem os frutos, mas somente das extremidades dos ramos, também o benefício maior da Ciência depende daquelas partes que por último aprendemos”.

A análise dos resultados deste estudo a respeito da expressão imuno-histoquímica da proteína GATA3 nos carcinomas mamários infiltrativos iniciais, permitiu as seguintes conclusões:

1. A proteína GATA3 foi positiva em quase totalidade dos casos (98,1%);
2. Houve preservação de GATA3 em todos os casos de carcinomas lobulares infiltrativos e aproximadamente 25% de redução nos outros tipos de neoplasias. A redução da expressão esteve associada com a indiferenciação tumoral (GHIII);
3. A preservação de GATA3 esteve associada com a positividade de RE, RP, RA e com a negatividade de HER2;
4. Com relação à preservação de GATA3 nos diversos subtipos imuno-histoquímicos, as maiores taxas de preservação foram identificadas nos tumores luminais-like (RE positivo e HER2 negativo) e as menores nos basais-like (RE negativos e HER2 negativos).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Tipos de Câncer. Câncer de mama. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acessado em 2020 (07 dez).
4. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
5. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.
6. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel).* 2011;6(2):136-41.
7. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(18):10393-8.
8. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020;38(12):1346-66.

9. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *J Am Med Assoc.* 2019;321(3):288-300.
10. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.
11. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic IB, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol.* 2014;32(25):2794-803.
12. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008;10(4):R65.
13. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67.
14. Hurvitz S, Mead M. Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2016;28(1):59-69.
15. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235(4785):177-82.
16. Larsen V, Barlow WE, Yang JJ, Zhu Q, Liu S, Kwan ML, et al. Germline genetic variants in GATA3 and breast cancer treatment outcomes in SWOG S8897 Trial and the Pathways Study. *Clin Breast Cancer.* 2019;19(4):225-35.

17. Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*. 2006;127(5):1041-55.
18. Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Illei PB, Sharma R, Halushka MK, Vang R, et al. GATA3 expression in breast carcinoma: utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas. *Hum Pathol*. 2013;44(7):1341-9.
19. Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, et al. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development*. 2010;137(3):395-403.
20. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh A, et al. Controle transcricional da expressão gênica. In: Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh A, et al. *Biologia celular e molecular*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2014. p. 279-87.
21. Chou J, Provot S, Werb Z. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J Cell Physiol*. 2010;222(1):42-9.
22. Asch-Kendrick R, Cimino-Mathews A. The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Hum Pathol*. 2016;48:37-47.
23. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*. 2019;50(6):1352-64.
24. Davis DG, Siddiqui MT, Oprea-Ilie G, Stevens K, Osunkoya AO, Cohen C et al. GATA-3 and FOXA1 expression is useful to differentiate breast carcinoma from other carcinomas. *Hum Pathol*. 2016;47(1):26-31.
25. Gonzalez RS, Wang J, Kraus T, Sullivan H, Adams AL, Cohen C. GATA-3 expression in male and female breast cancers: comparison of clinicopathologic parameters and prognostic relevance. *Hum Pathol*. 2013;44(6):1065-70.

26. Yoon NK, Maresh EL, Shen DJ, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, et al. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol*. 2010;41(12):1794-801.
27. Farber E, Cameron R. The sequential analysis of cancer development. *Adv Cancer Res*. 1980;31:125-226.
28. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
29. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
30. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
31. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):116-26.
32. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):157-62.
33. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148-59.
34. Riley LB, Desai DC. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. *Surg Clin North Am*. 2009;89(1):1-15.
35. Lima SCS, Hernandez-Vargas H, Herceg Z. Epigenetic signatures in cancer: implications for the control of cancer in the clinic. *Curr Opin Mol Ther*. 2010;12(3):316-24.
36. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13556-61.
37. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):755-68.

38. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):791-9.
39. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
40. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
41. Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA. Growth factors. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 41-64.
42. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*. 1987;237(4811):178-82.
43. Medema RH, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*. 1993;4(6):615-61.
44. Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(9):2848-52.
45. Curran T, Peters G, Van Beveren C, Teich NM, Verma IM. FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J Virol*. 1982;44(2):674-82.
46. Zheng R, Blobel GA. GATA transcription factors and cancer. *Genes Cancer*. 2010;1(12):1178-88.
47. Crispino JD. GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(1):137-47.
48. Ciovacco WA, Raskind WH, Kacena MA. Human phenotypes associated with GATA-1 mutations. *Gene*. 2008;427(1-2):1-6.

49. Munugalavadla V, Dore LC, Tan BL, Hong L, Vishnu M, Weiss MJ, et al. Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(15):6747-59.
50. Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood.* 2003;102(8):2960-8.
51. Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol.* 1993;13(7):4011-22.
52. Byrne DJ, Deb S, Takano EA, Fox SB. GATA3 expression in triple-negative breast cancers. *Histopathology.* 2017;71(1):63-71.
53. Yang Z, Gu L, Romeo PH, Bories D, Motohashi H, Yamamoto M, et al. Human GATA-3 trans-activation, DNA-binding, and nuclear localization activities are organized into distinct structural domains. *Mol Cell Biol.* 1994;14(3):2201-12.
54. Takaku M, Grimm SA, Wade PA. GATA3 in breast cancer: tumor suppressor or oncogene? *Gene Expr.* 2015;16(4):163-8.
55. Ko LJ, Yamamoto M, Leonard MW, George KM, Ting P, Engel JD. Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer. *Mol Cell Biol.* 1991;11(5):2778-84.
56. Ho IC, Vorhees P, Marin N, Oakley BK, Tsai SF, Orkin SH, et al. Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 1991;10(5):1187-92.
57. Ho IC, Tai TS, Pai SY. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(2):125-35.

58. Samson SI, Richard O, Tavian M, Ranson T, Vosshenrich CAJ, Colucci F, et al. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity*. 2003;19(5):701-11.
59. Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, et al. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol*. 2007;9(2):201-9.
60. Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. 2000;290(5489):134-8.
61. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-56.
62. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*. 1991;5(9):1538-52.
63. Song H, Suehiro JI, Kanki Y, Kawai Y, Inoue K, Daida H, et al. Critical role for GATA3 in mediating Tie2 expression and function in large vessel endothelial cells. *J Biol Chem*. 2009;284(42):29109-24.
64. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, et al. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):513-26.
65. Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, et al. Angiopoietin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem*. 2009;284(9):5592-601.

66. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995;376(6535):70-4.
67. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol*. 2006;27(12):552-8.
68. Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, et al. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:51-71.
69. Takaku M, Grimm SA, De Kumar B, Bennett BD, Wade PA. Cancer-specific mutation of GATA3 disrupts the transcriptional regulatory network governed by estrogen receptor alpha, FOXA1 and GATA3. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(9):4756-68.
70. Ciocca V, Daskalakis C, Ciocca RM, Ruiz-Orrico A, Palazzo JP. The significance of GATA3 expression in breast cancer: a 10-year follow-up study. *Hum Pathol*. 2009;40(4):489-95.
71. Nehrt NL, Peterson TA, Park D, Kann MG. Domain landscapes of somatic mutations in cancer. *BMC Genomics*. 2012;13 Suppl 4:S9.
72. Reimand J, Bader GD. Systematic analysis of somatic mutations in phosphorylation signaling predicts novel cancer drivers. *Mol Syst Biol*. 2013;9:637.
73. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. 2014;25(3):304-17.
74. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, et al. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*. 2015;525(7568):206-11.
75. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell*. 2015;163(2):506-19.

76. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012;486(7403):405-9.
77. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016;534(7605):47-54.
78. Mair B, Konopka T, Kerzendorfer C, Sleiman K, Salic S, Serra V, et al. Gain- and loss-of-function mutations in the breast cancer gene GATA3 result in differential drug sensitivity. *PLoS Genet*. 2016;12(9):e1006279.
79. Emmanuel N, Lofgren KA, Peterson EA, Meier DR, Jung EH, Kenny PA. Mutant GATA3 actively promotes the growth of normal and malignant mammary cells. *Anticancer Res*. 2018;38(8):4435-41.
80. Eeckhoutte J, Keeton EK, Lupien M, Krum SA, Carroll JS, Brown M. Positive 60-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2007;67(13):6477-83.
81. Theodorou V, Stark R, Menon S, Carroll JS. GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. *Genome Res*. 2013;23(1):12-22.
82. Hoch RV, Thompson DA, Baker RJ, Weigel RJ. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer*. 1999;84(2):122-8.
83. Du F, Yuan P, Wang T, Zhao J, Zhao Z, Luo Y, et al. The significance and therapeutic potential of GATA3 expression and mutation in breast cancer: a systematic review. *Med Res Rev*. 2015;35(6):1300-15.
84. Tominaga N, Naoi Y, Shimazu K, Nakayama T, Maruyama N, Shimomura A, et al. Clinicopathological analysis of GATA3-positive breast cancers with special reference to response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2012;23(12):3051-7.

85. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400-4.
86. Usary J, Llaca V, Karaca G, Presswala S, Karaca M, He X, et al. Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene*. 2004;23(46):7669-78.
87. Nesbit MA, Bowl MR, Harding B, Ali A, Ayala A, Crowe C, et al. Characterization of GATA3 mutations in the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22624-34.
88. Takaku M, Grimm SA, Roberts JD, Chrysovergis K, Bennett BD, Myers P, et al. GATA3 zinc finger 2 mutations reprogram the breast cancer transcriptional network. *Nat Commun*. 2018;9(1):1059.
89. Fararjeh AFS, Tu SH, Chen LC, Liu YR, Lin YK, Chang HL, et al. The impact of the effectiveness of GATA3 as a prognostic factor in breast cancer. *Hum Pathol*. 2018;80:219-30.
90. Wilson BJ, Giguère V. Meta-analysis of human cancer microarrays reveals GATA3 is integral to the estrogen receptor alpha pathway. *Mol Cancer*. 2008;7:49.
91. Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, et al. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res*. 2000;60(16):4346-8.
92. Kim S, Moon BI, Lim W, Park S, Cho MS, Sung SH. Expression patterns of GATA3 and the androgen receptor are strongly correlated in patients with triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2016;55:190-5.
93. Severson TM, Kim Y, Joosten SEP, Schuurman K, van der Groep P, Moelans CB, et al. Characterizing steroid hormone receptor chromatin

- binding landscapes in male and female breast cancer. *Nat Commun.* 2018;9(1):482.
94. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim JW, Provot S, Werb Z. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol.* 2013;15(2):201-13.
 95. Li M, Qi Y, Chen M, Wang Z, Zeng, Xiao Y, et al. GATA binding protein 3 boosts extracellular ATP hydrolysis and inhibits metastasis of breast cancer by up-regulating ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Int J Biol Sci.* 2019;15(12):2522-37.
 96. Morciano G, Sarti AC, Marchi S, Missiroli S, Falzoni S, Raffaghello L, et al. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat Protoc.* 2017;12(8):1542-62.
 97. Yu W, Huang W, Yang Y, Qiu R, Zeng Y, Hou Y, et al. GATA3 recruits UTX for gene transcriptional activation to suppress metastasis of breast cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(11):832.
 98. Bertucci F, Ng CKY, Patsouris A, Droin N, Piscuoglio S, Carbuccion N, et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature.* 2019;569(7757):560-4.
 99. Hu X, Xiang D, Xie Y, Tao L, Zhang Y, Jin Y, et al. LSD1 suppresses invasion, migration and metastasis of luminal breast cancer cells via activation of GATA3 and repression of TRIM37 expression. *Oncogene.* 2019;38(44):7017-34.
 100. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell.* 2013;153(1):17-37.
 101. Xu G, Chhangawala S, Cocco E, Razavi P, Cai Y, Otto JE, et al. ARID1A determines luminal identity and therapeutic response in estrogen-receptor-positive breast cancer. *Nat Genet.* 2020;52(2):198-207.

102. Encinas G, Sabelnykova VY, de Lyra EC, Katayama MLH, Maistro S, Valle PWMV, et al. Somatic mutations in early onset luminal breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(32):22460-79.
103. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
104. Yan W, Cao QJ, Arenas RB, Bentley B, Shao R. GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2010;285(18):14042-51.
105. Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CLR, Stern PL, et al. Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res*. 2007;67(23):11254-62.
106. De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, Peterse JL, Van de Vijver MJ, Litvinov S, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol*. 1997;183(4):404-11.
107. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci*. 2008;121(6):727-35.
108. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2727-32.
109. Si W, Huang W, Zheng Y, Yang Y, Liu X, Shan L, et al. Dysfunction of the reciprocal feedback loop between GATA3- and ZEB2-nucleated repression programs contributes to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*. 2015;27(6):822-36.
110. Zeng Y, Gao T, Huang W, Yang Y, Qiu R, Hou Y, et al. MicroRNA-455-3p mediates GATA3 tumor suppression in mammary epithelial cells by inhibiting TGF- β signaling. *J Biol Chem*. 2019;294(43):15808-25.

111. Luo M, Huang Y, Huang J, Huang S, Wei L, Zhang Y, et al. Evaluation of the value of GATA3 combined with E-cadherin in the diagnosis of breast cancer. *J Buon*. 2019;24(3):1038-44.
112. Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res*. 2005;65(14):5996-6000.
113. Morrogh M, Andrade VP, Giri D, Sakr RA, Paik W, Qin LX, et al. Cadherin-catenin complex dissociation in lobular neoplasia of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(2):641-52.
114. Hollestelle A, Peeters JK, Smid M, Timmermans M, Verhoog LC, Westenend PJ, et al. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):47-57.
115. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii89-92.
116. Zou D, Yoon HS, Anjomshoaa A, Perez D, Fukuzawa R, Guilford P, et al. Increased levels of active c-Src distinguish invasive from in situ lobular lesions. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R45.
117. Reed AEMC, Kutasovic JR, Vargas AC, Jayanthan J, Al-Murrani A, Reid LE, et al. An epithelial to mesenchymal transition programme does not usually drive the phenotype of invasive lobular carcinomas. *J Pathol*. 2016;238(4):489-94.
118. Tozbikian GH, Zynger DL. A combination of GATA3 and SOX10 is useful for the diagnosis of metastatic triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2019;85:221-7.
119. Gown AM, Fulton RS, Kandalaft PL. Markers of metastatic carcinoma of breast origin. *Histopathology*. 2016;68(1):86-95.

120. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*. 2000;89(2):111-7.
121. Kandalaft PL, Simon RA, Isacson C, Gown AM. Comparative sensitivities and specificities of antibodies to breast markers GCDFP-15, mammaglobin A, and different clones of antibodies to GATA-3: a study of 338 tumors using whole sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(9):609-14.
122. Bonacho T, Rodrigues F, Liberal J. Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast: a review. *Biotech Histochem*. 2020;95(2):71-91.
123. Sears D, Hajdu SI. The cytologic diagnosis of malignant neoplasms in pleural and peritoneal effusions. *Acta Cytol*. 1987;31(2):85-97.
124. Egan AM, McPhillips D, Sarkar S Breen DP. Malignant pleural effusion. *QJM*. 2014;107(3):179-84.
125. DeCamp Jr MM, Mentzer SJ, Swanson SJ, Sugarbaker DJ. Malignant effusive disease of the pleura and pericardium. *Chest*. 1997;112(4 Suppl):291S-5S.
126. Grunze H. The comparative diagnostic accuracy, efficiency and specificity of cytologic technics used in the diagnosis of malignant neoplasm in serous effusions of the pleural and pericardial cavities. *Acta Cytol*. 1964;8:150-63.
127. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, et al. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(1):13-22.

128. Shield PW, Papadimos DJ, Walsh MD. GATA3: a promising marker for metastatic breast carcinoma in serous effusion specimens. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(4):307-12.
129. Lew M, Pang JC, Jing X, Fields KL, Roh MH. Young investigator challenge: the utility of GATA3 immunohistochemistry in the evaluation of metastatic breast carcinomas in malignant effusions. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(10):576-81.
130. Braxton DR, Cohen C, Siddiqui MT. Utility of GATA3 immunohistochemistry for diagnosis of metastatic breast carcinoma in cytology specimens. *Diagn Cytopathol.* 2015;43(4):271-7.
131. Krings G, Nystrom M, Mehdi I, Vohra P, Chen YY. Diagnostic utility and sensitivities of GATA3 antibodies in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol.* 2014;45(11):2225-32.
132. Liu H, Shi J, Prichard JW, Gong Y, Lin F. Immunohistochemical evaluation of GATA-3 expression in ER-negative breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(5):648-55.
133. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(1):103-13.
134. Clark BZ, Beriwal S, Dabbs DJ, Bhargava R. Semiquantitative GATA-3 immunoreactivity in breast, bladder, gynecologic tract, and other cytokeratin 7-positive carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(1):64-71.
135. Waters L, Crumley S, Truong L, Mody D, Coffey D. PAX2 and PAX8: useful markers for metastatic effusions. *Acta Cytol.* 2014;58(1):60-6.
136. Wiseman W, Michael CW, Roh MH. Diagnostic utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of metastatic Müllerian carcinoma in effusions. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(9):651-6.

137. Huang CC, Attele A, Michael CW. Cytomorphologic features of metastatic urothelial carcinoma in serous effusions. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(7):569-74.
138. Woodard AH, Yu J, Dabbs DJ, Beriwal S, Florea AV, Elishaev E, et al. NY-BR-1 and PAX8 immunoreactivity in breast, gynecologic tract, and other CK7+ carcinomas: potential use for determining site of origin. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(3):428-35.
139. Esheba GE, Longacre TA, Atkins KA, Higgins JP. Expression of the urothelial differentiation markers GATA3 and placental S100 (S100P) in female genital tract transitional cell proliferations. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(3):347-53.
140. Yu KD, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, et al. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(10):2723-33.141.
141. Lopez G, Costanza J, Colleoni M, Fontana L, Ferrero S, Miozzo M, et al. Molecular insights into the classification of luminal breast cancers: the genomic heterogeneity of progesterone-negative tumors. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):510.
142. Guo Y, Yu P, Liu Z, Maimaiti Y, Chen C, Zhang Y, et al. Prognostic and clinicopathological value of GATA binding protein 3 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Plos One*. 2017;12(4):e0174843.
143. Lin HY, Zeng D, Liang YK, Wei XL, Chen CF. GATA3 and TRPS1 are distinct biomarkers and prognostic factors in breast cancer: database mining for GATA family members in malignancies. *Oncotarget*. 2017;8(21):34750-61.
144. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77(2):181-5.

145. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
146. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
147. Evans T, Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*. 1989;58(5):877-85.
148. Zon LI, Gurish MF, Stevens RL, et al. GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J Biol Chem*. 1991;266(34):22948-53.
149. Simon MC. Gotta have GATA. *Nat Genet*. 1995;11(1):9-11.
150. Garcia FOT, Furuya TKM, Pazini FS. Controle da expressão gênica e suas alterações no câncer. In: Saito RF, Lana MV, Medrano RFV, Chammas R. Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo: Editora Atheneu; 2015. p. 117-32.
151. Browning DF, Busby SJ. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(1):57-65.
152. Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*. 2000;14(20):2551-69.
153. Hannenhalli S. Eukaryotic transcription factor binding sites-modeling and integrative search methods. *Bioinformatics*. 2008;24(11):1325-31.
154. Kouros-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, Littlepage LE, Egeblad M, Ewald AJ, et al. GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer Cell*. 2008;13(2):141-52.

155. Cimino-Mathews A. Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology: interpretation and pitfalls. *Modern Pathol.* 2020.
156. Deftereos G, Ramirez AMS, Silverman JF, Krishnamurti U. GATA3 immunohistochemistry expression in histologic subtypes of primary breast carcinoma and metastatic breast carcinoma cytology. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(9):1282-9.
157. Voduc D, Cheang M, Nielsen T. GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(2):365-73.
158. Ni YB, Tsang JYS, Shao MM, et al. GATA-3 is superior to GCDFP-15 and mammaglobin to identify primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;169(1):25-32.
159. Sangoi AR, Shrestha B, Yang G, et al. The novel marker GATA3 is significantly more sensitive than traditional markers mammaglobin and GCDFP15 for identifying breast cancer in surgical and cytology specimens of metastatic and matched primary tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(4):229-37.
160. De Lara S, Parris TZ, Rönnerman EW, et al. GATA3 as a putative marker of breast cancer metastasis - A retrospective immunohistochemical study. *Breast J.* 2018;24(2):184-8.
161. Lu S, Yakirevich E, Wang LJ, Resnick MB, Wang Y. Cytokeratin 7-negative and GATA binding protein 3-negative breast cancers: clinicopathological features and prognostic significance. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1085.
162. Poon IK, Tsang JY, Li J, Chan SK, Shea KH, Tse GM. (2020) The significance of highlighting the oestrogen receptor low category in breast cancer. *Br J Cancer.* 123(8):1223-7.

163. Shaoxian T, Baohua Y, Xiaoli X, et al. Characterisation of GATA3 expression in invasive breast cancer: differences in histological subtypes and immunohistochemically defined molecular subtypes. *J Clin Pathol*. 2017;70(11):926-34.
164. Stolnicu S, Tunde C, Cadar A, Boros M. Differences in GATA3 expression among histological/molecular subtypes and grades in infiltrating breast carcinoma (IBC) are important in the diagnosis of metastatic breast carcinoma. *Pol J Pathol*. 2020;71(1):62-5.
165. Cakir A, Isik Gonul I, Ekinci O, et al. GATA3 expression and its relationship with clinicopathological parameters in invasive breast carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2017;213(3):227-34.
166. Min KW, Kim DH, Do SI, et al. Negative association between GATA3 and fascin could predict relapse-free and overall survival in patients with breast cancer. *Virchows Arch*. 2016;468(4):409-16.
167. Parikh P, Palazzo JP, Rose LJ, et al. GATA-3 expression as a predictor of hormone response in breast cancer. *J Am Coll Surg*. 2005;200(5):705-10.
168. Mehra R, Varambally S, Ding L, et al. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res*. 2005;65(24):11259-64.
169. Gulbahce HE, Sweeney C, Surowiecka M, et al. Significance of GATA-3 expression in outcomes of patients with breast cancer who received systemic chemotherapy and/or hormonal therapy and clinicopathologic features of GATA-3-positive tumors. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2427-31.
170. Liu XY, Ma D, Xu XE, Jin X, Yu KD, Jiang YZ et al. Genomic landscape and endocrine-resistant subgroup in estrogen receptor-positive,

progesterone receptor-negative, and HER2-negative breast cancer. *Theranostics*. 2018;8(22):6386-99.

171. Tahiri A, Tekpli X, Satheesh SV, DeWijn R, Lüders T, Bukholm IR et al. Loss of progesterone receptor is associated with distinct tyrosine kinase profiles in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;183:585-98.
172. Jiang C, Wu S, Jiang L, et al. Network-based approach to identify biomarkers predicting response and prognosis for HER2-negative breast cancer treatment with taxane-anthracycline neoadjuvant chemotherapy. *Peer J*. 2019;7:e7515.
173. Angulo KRA, Jawa Z, Visotcky A, et al. A high mitotic score in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy is predictive of outcome and associated with a distinct morphology. *Histopathology*. 2020;76(5):661-70.

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GATA3 EM CARCINOMAS INFILTRATIVOS MAMÁRIOS NOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVOS E HER2 POSITIVOS E SEU VALOR PROGNÓSTICO

Pesquisador: PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56269416.0.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.604.792

Apresentação do Projeto:

A expressão do gene GATA3 esta relacionada a vários mecanismos de diferenciação das células mamárias. A melhor compreensão destes mecanismos parece ser de fundamental importância na avaliação do prognóstica e elucidação dos fatores envolvidos no comportamento biológico e resposta terapêutica dos diversos subtipos histológicos de câncer de mama, tais como os subtipos triplo negativos e HER2 positivos os quais serão avaliados neste estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão do gene GATA3 nos subtipos triplo negativos e Her2 positivos dos carcinomas infiltrativos mamários. Sendo os objetivos específicos: a) Determinar a frequência de carcinomas de mama triplo negativos que expressam o gene GATA3; b) Determinar a frequência de carcinomas de mama Her2 positivos que expressam o gene GATA3; c) Quantificar a expressão imunohistoquímica de GATA3; d) Explorar as associações entre expressão de GATA-3 e características anatomopatológicas prognóstica clássicas: tamanho do tumor, status axilar, tipo histológico, grau histológico, presença de embolização vascular peritumoral, atividade proliferativa determinada pela expressão de Ki-67. Além de associação com infiltração linfocitária intratumoral e fosfohistona H3; e) Avaliar a influência da expressão do gene GATA3 sobre o prognóstico de carcinomas triplo negativos; f) Avaliar a influência da expressão do gene GATA3 sobre o

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

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.604.792

prognóstico de carcinomas Her2 positivos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo visa a análise de prontuários e material biológico já colhido das pacientes, o qual não proporcionará riscos e neste primeiro momento a análise de GATA3 não proporcionará nenhum benefício as pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A análise da expressão de GATA3 nos subtipos triplo negativos e HER2 positivos de pacientes com câncer de mama pode acrescentar em conjunto com a avaliação prognóstica informações que contribuam para o entendimento dos fatores envolvidos no comportamento biológico e resposta terapêutica destes subtipos de tumores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Pesquisador adicionou o TCLE conforme solicitado em parecer anterior.

Recomendações:

Nada a adicionar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto 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_686919.pdf	16/06/2016 11:07:57		Aceito
Outros	Resolucao_de_Pendencia_CEP.docx	16/06/2016 11:07:11	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GATA.doc	16/06/2016 11:03:04	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/05/2016 19:15:45	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	11/05/2016 19:11:08	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Outros	Formulario____.pdf	11/05/2016 19:10:06	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito

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

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.604.792

Outros	Formulario____.pdf	11/05/2016 19:09:37	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Outros	Formulario____.pdf	11/05/2016 19:09:19	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Outros	Formulario__.pdf	11/05/2016 19:08:58	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Outros	Formulario_.pdf	11/05/2016 19:08:36	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Outros	Formulario.pdf	11/05/2016 19:08:17	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Dispensa_de_TCLE.pdf	11/05/2016 19:05:13	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.pdf	11/05/2016 19:05:00	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao.pdf	11/05/2016 19:04:40	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	11/05/2016 19:01:06	PRISCILA DE MEDEIROS SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Junho de 2016

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

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