

DANIEL RODRIGUES DE BASTOS

**Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico**

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

Programa de Oncologia

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lara Termini

São Paulo

2023

DANIEL RODRIGUES DE BASTOS

**Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico**

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

Programa de Oncologia

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lara Termini

São Paulo

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Daniel Rodrigues de  
Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um  
potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico  
/ Daniel Rodrigues de Bastos. -- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Oncologia.  
Orientadora: Lara Termini.

Descritores: 1.Neoplasias de mama triplo  
negativas 2.Biomarcadores 3.Receptores Wnt  
4.Prognóstico

USP/FM/DBD-135/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## Folha de avaliação

Bastos DR. Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico [doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedicar esse trabalho é hoje mais uma reflexão do que uma simples expressão. Eu fui uma pessoa extremamente apaixonada pela área acadêmica desde a minha mais tenra idade ou o que eu possa dela recordar. Eu sou do interior de Goiás, a vida simples e o trabalho duro sempre estiveram ao meu lado, tal como a poesia sertaneja e os contos de fada. A pós-graduação fez parte do meu mundo encantado, mas ela deixou marcas pesadas que preciso restaurar. Pensando nisso, talvez dedique as horas árduas, que foram minhas, ao meu próprio caminhar.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, aos meus irmãos e às minhas sobrinhas e cunhados por sempre mostrar e recordar o valor da simplicidade, pelo aconchego de ter um doce lar e todo apoio incondicional.

Ao meu grande companheiro André Henrique Cavalini que jamais deixa de acreditar e incentivar meus sonhos.

Às amigas de Gabriela Grazia, Giana Mota, Mércia Patrícia, Rafaella Almeida, Raquel Hessel e Ricardo Cesar que se iniciaram dentro do ambiente laboral e se estenderam para a vida.

Aos amigos Rodrigo e Angélica que compartilharam momentos incríveis durante a trajetória em São Paulo.

À Profa., Lara Termini por ter me recebido em seu laboratório e pelo coleguismo durante a jornada de trabalho para concluir as atividades da tese.

Ao Prof., Adhemar Longatto pela colaboração no estudo e principalmente pelo tempo que se dedicou a me ensinar a reconhecer regiões tumorais e níveis de marcação nas lâminas de TMA.

À Profa., Ludmila Ferreira pelos ensinamentos sobre o software IPA.

Ao Ricardo Cesar pela colaboração no estudo, especialmente na utilização da técnica de CRISPR/Cas9.

Ao Prof., Nelson Jorge da Silva Junior pelo suporte financeiro em insumos destinados a esse estudo e por sua singular amizade. Mais ainda pelo tempo de conversa que sempre me instruiu e motivou a ser uma pessoa melhor.

À Profa., Vera Aparecida Saddi que foi um importante caminho na iniciação pelo ramo da oncologia.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, ao Dr. Evandro Sobroza de Melo e ao serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por ceder amostras em *tissue microarray*.

À Profa., Maria Aparecida Nagai por me receber em seu laboratório, onde pude desenvolver habilidades computacionais para analisar dados de tumores de mama.

A todo o pessoal que dedica seu tempo na limpeza e organização do espaço laboratorial e aos guardas e recepcionistas que conjuntamente sempre fazem nosso dia ser mais gracioso. Em especial ao senhor Luiz, á Isa, a dona Sônia e Fernanda.

À Fayola e Renan do serviço de esterilização de materiais pelos momentos de boas conversas e por todo carinho dispensado em manter o ambiente sempre organizado.

Ao Luiz Henrique Ramos de Freitas do almoxarifado por toda empatia e momentos maravilhosos.

À secretaria de pós-graduação por atender com empatia, com sorrisos que mudam nossos dias.

À Rennova Innovapharma pela doação do anticorpo (anti-FZD9) que viabilizou a realização desse estudo.

Ao Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) pela infraestrutura proporcionada à execução desse estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo do desenvolvimento do estudo.

(...) nela eu aprendi a não preocupar quando fechar uma porta e não ver outra para abrir. Nela eu aprendi a ter confiança, que cada porta será apresentada no momento certo. Que engraçado foi, uma porta que ensinava de outras portas. E assim eu sigo a vida, abrindo e fechando portas. Algumas sei onde estão, outras só aparecem depois de fechar outras tantas. Se são as melhores portas eu não sei. Só sei que as abri e as fechei.

Daniel Bastos, 2022.



## RESUMO

Bastos DR. Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Os tumores de mama são frequentes em mulheres de todo o mundo, sendo responsáveis por um alto índice de óbito nessa população. Os tumores de mama se subdividem de acordo com a expressão dos receptores hormonais de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2). Desta forma podem ser categorizados como luminais, HER2 e triplo-negativo (TNBC). Os tumores luminais apresentam melhor prognóstico, especialmente pelo benefício terapêutico, seguido dos HER2 que se beneficiam de terapias alvo. O subtipo TNBC é negativo para HER2 e os receptores hormonais e não possui tratamento direcionado, o que colabora para que esse perfil tumoral apresente pior prognóstico. Apesar do avanço no tratamento e prevenção do câncer, uma parcela significativa da população é acometida por esses tumores e constantemente sofrem recidivas, piorando drasticamente o desfecho clínico, independente do subtipo tumoral. A via Wnt é amplamente discutida na literatura, e suas alterações têm sido observadas em diversas malignidades humanas, incluindo os cânceres de mama. O FZD9 é um membro da família frizzled, os quais são caracterizados por serem receptores transmembranares que se ativam por meio de glicoproteínas Wnt. O objetivo do trabalho consistiu em identificar genes diferencialmente expressos em tumores de mama não triplo-negativo (nTNBC) e TNBC e validar os achados em populações com maior número amostral, incluindo validação em amostras de tumores de mulheres brasileiras. Além disso, objetivamos analisar os efeitos da repressão de FZD9 em linhagem celular. A identificação do FZD9 partiu de análise estatística de amostras de pacientes com câncer de mama submetidas à análise de expressão pela técnica de array (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array). Foram utilizados dados de RNA-seq dos estudos TCGA e SCAN-B para validação do perfil de expressão de FZD9 em função das características clinico-patológicas das pacientes. Foram utilizados ainda amostras de tumores de mama para detecção de FZD9 por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHC). A repressão de FZD9 foi realizada pelo sistema lentivirus dCas9-KRAB-MeCP2 e o

sgRNA(MS2)\_zeo\_backbone. A repressão foi confirmada por RT-qPCR, seguindo com ensaios de crescimento celular, migração e clonogênico. O FZD9 foi identificado como diferencialmente expresso entre tumores nTNBC e TNBC e associado com uma pior sobrevida global e livre de doença em ambos os perfis tumorais. Na análise por IHC foram observadas diferenças quanto ao subtipo tumoral ( $p=0,04$ ) e status HER2 ( $0,009$ ). Os pacientes classificados com marcação positiva para o FZD9 apresentaram pior sobrevida global, comparados aos casos negativos ( $HR=2,37$ ;  $p=0,03$ ). Foi observada ainda uma associação de FZD9 e Ki67 ( $p=0,037$ ). O tratamento das linhagens celulares MDA-MB-453 e BT549 com TSA ou 5-aza resultou em diminuição dos níveis transcricionais de FZD9. A repressão de FZD9 por meio do sistema CRISPR modificado levou à diminuição do crescimento celular ( $p=0,001$ ), de migração e da capacidade de formação de colônias ( $p=0,002$ ). Ensaio adicionais precisam ser realizados a fim de comprovar o efeito da redução de FZD9 e seu papel na inibição da proliferação, migração e invasão em modelos celulares de câncer de mama. Contudo, sugere-se que a expressão diferencial de FZD9 possa ser um potencial alvo terapêutico e prognóstico para o benefício não apenas de pacientes portadoras de TNBC, mas também pacientes nTNBC.

**Palavras-chaves:** Neoplasias de mama triplo negativas. Biomarcadores. Receptores Wnt. Prognóstico.

## ABSTRACT

Bastos DR. Study of Frizzled receptor class 9 (FZD9), a potential prognostic biomarker and therapeutic target [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Breast tumors are frequent in women all over the world, being responsible for a high death rate in this population. Breast tumors are subdivided according to estrogen hormone receptors (ER) and progesterone (PR) and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) expression. In this way they can be categorized as luminal, HER2 and triple-negative (TNBC). Luminal tumors have a better prognosis, especially due to the therapeutic benefit, followed by HER2 tumors that benefit from targeted therapies. The TNBC subtype is negative for HER2 and hormone receptors and does not have targeted treatment, which contributes to a worse prognosis. Despite advances in cancer treatment and prevention, a significant portion of the population is affected by these tumors and constantly relapses, dramatically worsening the clinical outcome, regardless of the tumor subtype. The Wnt pathway is widely discussed in the literature, and its alterations have been observed in several human malignancies, including breast cancers. FZD9 is a member of the frizzled family, which are characterized by being transmembrane receptors that are activated through Wnt glycoproteins. The aim of this study was to identify differentially expressed genes in non-triple-negative breast tumors (nTNBC) and TNBC and to validate the findings in populations with a larger sample size, including validation in tumor samples from Brazilian women. Furthermore, we aimed to analyze the effects of FZD9 repression in cell lines. The identification of FZD9 was based on statistical analysis of samples from patients with breast cancer submitted to expression analysis using the array technique (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array). RNA-seq data from the TCGA and SCAN-B studies were used to validate the FZD9 expression profile as a function of the clinicopathological characteristics of the patients. Samples of breast tumors and immunohistochemical analysis (IHC) were also used to detect FZD9. FZD9 repression was performed by the dCas9-KRAB-MeCP2 lentivirus system and the sgRNA(MS2)\_zeo\_backbone. Repression was confirmed by RT-qPCR, followed by cell growth, migration and clonogenic assays. FZD9 was identified as differentially expressed between nTNBC and TNBC tumors and associated with worse overall and disease-free survival in both tumor profiles. In the IHC analysis, differences were

observed regarding tumor subtype ( $p=0.04$ ) and HER2 status (0.009). Patients classified as positive for FZD9 had worse overall survival compared to negative cases (HR=2.37;  $p=0.03$ ). An association of FZD9 and Ki67 was also observed ( $p=0.037$ ). Treatment of MDA-MB-453 and BT549 cell lines with TSA or 5-aza resulted in decreased transcriptional levels of FZD9. The repression of FZD9 through the modified CRISPR system led to a decrease in cell growth ( $p=0.001$ ), migration and colony formation capacity ( $p=0.002$ ). Additional trials need to be performed in order to prove the effect of FZD9 reduction and its role in inhibiting proliferation, migration and invasion in breast cancer cell models. However, FZD9 has been shown to be a potential therapeutic and prognostic target to benefit not only TNBC patients but also nTNBC patients.

**Keywords:** Triple negative breast neoplasms. Biomarkers. Receptors, Wnt. Prognosis.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Distribuição dos 10 tipos mais comuns de cânceres em ambos os sexos.	<b>19</b>
<b>Figura 2.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Classificação molecular do câncer de mama. ....	<b>24</b>
<b>Figura 4.</b> Subreposição subtipo intrínscio e clínico do câncer de mama. ....	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> Via de sinalização Wnt canônica e não canônica.....	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Desenho metodológico da análise in sílico.....	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> Volcano plot contendo as sondas diferencialmente expressas. ....	<b>42</b>
<b>Figura 8.</b> Expressão de FZD9 no conjunto de dados GSE76275.....	<b>45</b>
<b>Figura 9.</b> Expressão de FZD9 na população do TCGA .....	<b>48</b>
<b>Figura 10.</b> Padrão de metilação de FZD9.....	<b>48</b>
<b>Figura 11.</b> Expressão de FZD9 projeto SCAN-B e TCGA .....	<b>51</b>
<b>Figura 12.</b> Expressão de FZD9 projeto SCAN-B e TCGA.. ....	<b>52</b>
<b>Figura 13.</b> Papel prognóstico de FZD9 em diferentes estudos e distintos perfis prognósticos.. ....	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b> Análise de sobrevivência em função da expressão mediana de FZD9.....	<b>53</b>
<b>Figura 15.</b> O padrão de expressão de FZD9 apenas em pacientes tratados com quimioterapia.. ....	<b>55</b>
<b>Figura 16.</b> Expressão de FZD9 antes e após tratamento neoadjuvante.....	<b>56</b>
<b>Figura 17.</b> Diagrama de cordas. ....	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b> Padronização imuno-histoquímica para o anti-FZD9 em lâminas de biópsias provenientes de pacientes com glioblastoma.....	<b>58</b>
<b>Figura 19.</b> Padronização imuno-histoquímica para o anti-FZD9 em lâminas de biópsias provenientes de pacientes com câncer de mama triplo-negativo.. ....	<b>59</b>
<b>Figura 20.</b> Análise imuno-histoquímica em tissue microarray de pacientes com câncer de mama.....	<b>60</b>
<b>Figura 21.</b> Análise imuno-histoquímica com score de expressão de FZD9.....	<b>62</b>
<b>Figura 22.</b> Sobrevivência global.....	<b>62</b>
<b>Figura 23.</b> Expressão de FZD9 por qRT-PCR.. ....	<b>63</b>
<b>Figura 24.</b> Análise de expressão após tratamento com tricostatina A ou 5-AZA .....	<b>64</b>
<b>Figura 25.</b> Confirmação da técnica de CRISPR. ....	<b>65</b>
<b>Figura 26.</b> Ensaios funcionais em HeLa após repressão de FZD9.....	<b>66</b>

**Figura 27. Ensaio de migração.....67**

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Estudos disponíveis na literatura com descrição da expressão de FZD9. <b>31</b>	
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligos de repressão e de primers para análise da expressão do gene de interesse. .... <b>38</b>	
<b>Tabela 3.</b> Top 10 genes diferencialmente expressos entre TN e nTN após análise no GEO2R, utilizando o conjunto de dados GSE76275 e análise de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva a partir da ferramenta KM Plotter. .... <b>44</b>	
<b>Tabela 4.</b> Características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama triplo negativo e não triplo negativo oriundas do banco de dados GEO GSE76275 e associação com a expressão de FZD9..... <b>46</b>	
<b>Tabela 5.</b> Relação entre a expressão de FZD9 e parâmetros clínicos de pacientes com câncer de mama usando o banco de dados bc-GenExMiner. .... <b>50</b>	
<b>Tabela 6.</b> Características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama após análise imuno-histoquímica de FZD9..... <b>61</b>	

## Sumário

1. INTRODUÇÃO-----	18
1.1 Epidemiologia do câncer de mama-----	18
1.2 Classificação histológica e molecular-----	20
1.3 Via de sinalização WNT-----	25
1.4 FZD9-----	28
2. OBJETIVO-----	32
2.1 Objetivo geral-----	32
2.2 Objetivos específicos-----	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS-----	33
3.1 Análises <i>in silico</i> -----	33
3.1.1 Acesso ao <i>Geo database</i> -----	33
3.1.2 Análise de expressão-----	33
3.1.3 Análise de sobrevivência-----	34
3.1.4 Dados do cBioPortal-----	34
3.1.5 Análise de Plotter ROC-----	34
3.2 Análise de espécimes biológicos e estudos <i>in vitro</i> -----	35
3.2.1 Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão Interna de Biossegurança-----	35
3.2.2 Validação e análise imuno-histoquímica-----	35
3.2.3 Cultura de células em monocamada-----	36
3.2.4 Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR-----	36
3.2.5 Tratamento com TSA e 5-AZA-----	38
3.2.6 Desenho dos guides, transdução-----	39
3.2.7 Ensaio de <i>doblo time</i> celular-----	40
3.2.8 Migração celular-----	40
3.2.9 Formação de colônia-----	41
3.3 Análise estatística-----	41
4. RESULTADOS-----	42
4.1 <i>Geo database</i> : identificação do FZD9-----	42
4.2 Validação <i>in silico</i> do FZD9-----	47
4.2.1 The Cancer Genome Atlas (TCGA)-----	47
4.2.2 The Sweden Cancerome Analysis Network - Breast (SCAN-B)-----	49
4.2.3 Análise prognóstica de FZD9-----	52



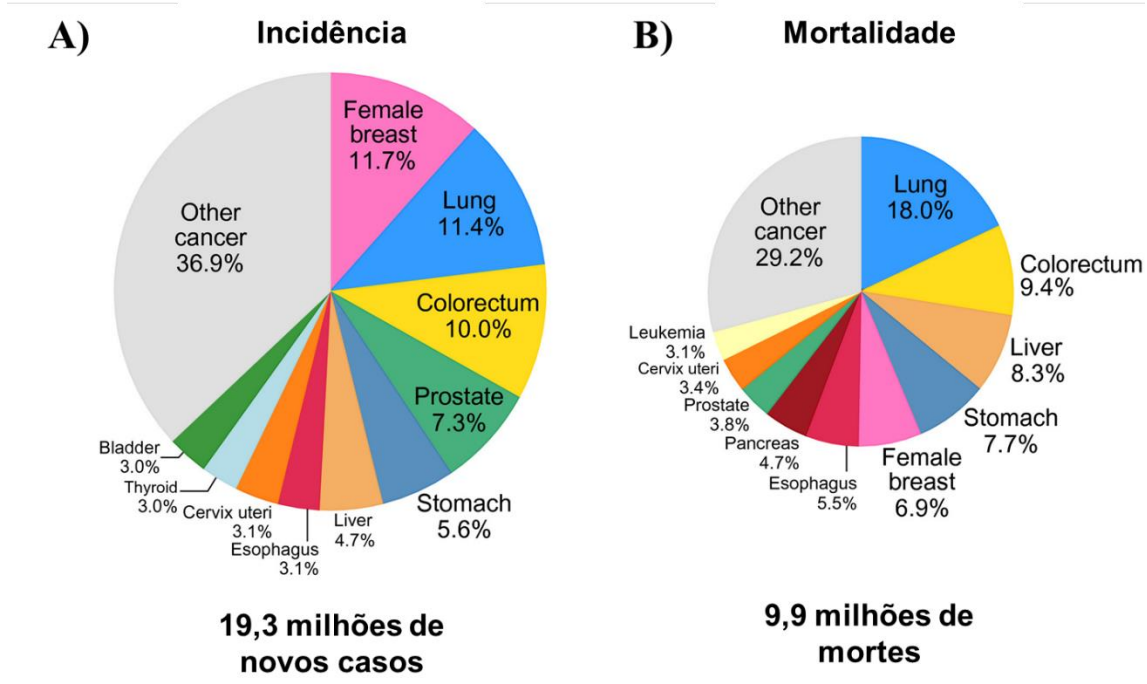
4.2.4 Associação de FZD9 e resposta terapêutica -----	54
4.2.5 Rede de interação gênica e medicamentosa -----	56
4.3 Validação de FZD9 em população de mulheres brasileiras por IHC -----	58
4.4 FZD9 em linhagens celulares -----	63
4.5 Validação da técnica de CRISPR -----	64
5. DISCUSSÃO -----	68
6. CONCLUSÕES -----	75
6. REFERÊNCIAS -----	76
ANEXO 1 -----	88
ANEXO 2 -----	91
ANEXO 3 -----	94

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é uma doença de interesse mundial, acometendo mulheres de todo o globo e uma pequena parcela da população masculina. Menos de 1% dos casos de cânceres de mama são diagnosticados em homens, fazendo com que essa doença seja quase que exclusivamente feminina (GHONCHEH et al., 2016; MEDIMEGH et al., 2014; SOCIETY, 2018). A *World Health Organization* (WHO) e a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) vêm desempenhando esforços significativos por meio de implementação de guias técnicos e políticas de combate ao câncer por todo o mundo. Esses esforços muito têm contribuído para alterar o cenário clínico e epidemiológico, embora dados estatísticos apontem para aumento de novos casos. As estimativas do projeto Globocan referente ao ano de 2020 mostram uma ocorrência de cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer, ou 18,1 milhões se excluído o câncer de pele não-melanoma. Foram registrados 10 milhões de óbitos devido ao câncer, dos quais 9,9 milhões referem aos casos de câncer de pele não-melanoma. Em anos anteriores, o câncer de mama ocupava a segunda posição de maior incidência, ainda que considerando ambos os sexos. Na última atualização, este tipo tumoral, ultrapassou o câncer de pulmão, sendo o câncer mais comumente diagnosticado com 2,3 milhões de novos casos (11,7%) (Figura 1). O câncer de mama é o quinto tipo tumoral que gera mais mortes, com 684.996 (6,9%) registros de óbitos, considerando-se ambos os sexos. Ao estratificar a população por sexo feminino esse índice de morte alcança a primeira posição (F. BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021; THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2018).

No Brasil, o cenário de incidência reflete de modo impreciso as estatísticas mundiais, exceto o previsto para o câncer de mama. São esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio de 2023 a 2025. Excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, que corresponde a 31,3% do total de casos, o câncer de mama feminino ocupa o primeiro lugar de maior incidência, com 10,5% do total de casos, seguido pelo câncer de próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%). Estratificando por sexo, o câncer de mama feminino representa 30,1% do total de cânceres (exceto pele não-melanoma), que corresponde a 73.610 novos casos (Figura 2). No Estado de São Paulo, as estatísticas estimaram 20.470 novos casos de câncer de mama para o ano de 2023 (INCA, 2023).



**Figura 1.** Distribuição dos 10 tipos mais comuns de cânceres em ambos os sexos. A) incidência de novos casos de câncer em todo o mundo. B) mortalidade por câncer em todo o mundo. Adaptado de (SUNG et al., 2021).

O número de óbitos também tem sofrido alterações crescentes ao longo dos anos. De acordo com o INCA, quanto à localização primária do tumor e sexo feminino, foram registradas 17.825 (16,5%) mortes por câncer de mama no Brasil durante o ano de 2020, que corresponde à primeira posição em mortalidade. Na sequência observa-se o câncer de pulmão (11,6%), cólon e reto (9,6%), colo do útero (6,1%) e pâncreas (5,5%) como agentes causais de uma parcela significativa de óbitos na população brasileira (INCA, 2023).

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%	
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mama feminina	73.610	30,1%	
Cólon e Reto	21.970	9,2%		Mulheres	Cólon e Reto	23.660	9,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	14.540	6,0%
Cavidade Oral	10.900	4,6%			Glândula Tireoide	14.160	5,8%
Esófago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

**Figura 2.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma. Dado extraído do INCA, 2023.

## 1.2 Classificação histológica e molecular

O câncer de mama é uma doença complexa e multifatorial. Dados epidemiológicos e experimentais sugerem que o curso natural de progressão do câncer de mama é precedido por pequenas lesões de potencial pré-maligno. Essas lesões podem surgir em diferentes regiões anatômicas da mama e, devido a esse fato, podem ser classificadas como: hiperplasia ductal atípica (ADH) e carcinoma ductal *in situ* (CDIS), ambos restritos aos ductos mamários; hiperplasia lobular atípica (ALH) e carcinoma lobular *in situ* (LCIS), restritos aos lóbulos mamários (ALLRED; MOHSIN; FUQUA, 2001). Polyak (2007) descreve o processo de progressão tumoral, desde o tecido normal, que exposto a fatores de risco, podem evoluir para hiperplasias e carcinomas *in situ* com posterior evolução para um carcinoma invasor. Se não detectado e tratado, o carcinoma invasor pode evoluir através de sua disseminação, com aparecimento de metástases linfonodais loco-regionais e à distância (ALLRED; MOHSIN; FUQUA, 2001; POLYAK, 2007; ZHANG; LEE; ROSEN, 2017).

A prática clínica subdivide os cânceres de mama em quatro grupos distintos, determinados pelos caracteres morfológicos e quanto à sua localização anatômica (CEDOLINI et al., 2014). São eles: (i) carcinoma ductal *in situ* (CDIS), proliferação maligna que acomete os ductos mamários, neste caso as células tumorais se localizam restritamente aos ductos, não acometendo nenhuma estrutura adjacente (HAN; KHAN, 2018); (ii) carcinoma lobular *in situ* (LCIS), semelhante ao observado no CDIS, porém, acomete células do lóbulo mamário – região glandular onde é produzido o leite materno, com risco considerável para desenvolvimento de câncer invasivo (GINTER; D'ALFONSO, 2017; WONG et al., 2017); (iii) carcinoma inflamatório (CI), formação tumoral mais rara, embora altamente agressiva. Este tipo tumoral ocorre quando os vasos linfáticos são obstruídos por células tumorais, gerando um processo inflamatório de rápido desenvolvimento (EL-SHINAWI et al., 2016; MATSUDA et al., 2017); (iv) carcinoma ductal invasivo (CDI), possui origem nos ductos mamários e apresenta características agressivas. Pacientes acometidas pelo CDI podem ter tecidos adjacentes acometidos com alta probabilidade de desenvolver metástases linfonodais e à distância (WOODS et al., 2018). O CDI é o tipo de câncer de mama mais comum e representa cerca de 70% a 80% dos casos de câncer de mama invasivos diagnosticados (ARPS et al., 2013; MAKKI, 2015), e; (v) carcinoma lobular invasivo (CLI), semelhante ao CDI, embora de origem nos lóbulos mamários,

representando entre 5 e 15% dos cânceres de mama invasivos (ARPS et al., 2013; BARROSO-SOUSA; METZGER-FILHO, 2016).

Do ponto de vista molecular, os trabalhos de Perou, Sorlie e Lehmann se destacam pela iniciativa na utilização da técnica de cDNA *microarray* que resultou na identificação de diferentes subgrupos de câncer de mama. Perou e colaboradores (2000), utilizando de técnica de cDNA *microarray* analisaram o comportamento molecular de 42 amostras de câncer de mama e concluíram que esses tumores poderiam ser subdivididos em grupos de acordo com o padrão de expressão gênica apresentado. Alguns subgrupos emergiram a partir de então, sendo eles: ER+/luminal-like, basal-like, HER2+ e normal-like (PEROU et al., 2000). Posteriormente, a classificação sofreu alterações, e cinco distintos subgrupos foram determinados: Luminal A, Luminal B, HER+, Normal-like e Basal-like (SØRLIE et al., 2001). Já o trabalho de Lehmann e colaboradores ocupou-se de analisar os tumores triplo-negativos (TN) devido a vasta heterogeneidade por eles apresentada (LEHMANN et al., 2011, 2016).

Os tumores luminais A são os mais frequentes, representam em torno de 40 a 50% de todos os casos de cânceres de mama. Na análise imuno-histoquímica, são positivos para ER ( $\geq 1\%$  de marcação) e PR ( $\geq 20\%$  de marcação), negativos para HER2 ( $\leq 10\%$  de marcação) e possuem baixa marcação para Ki67 ( $\leq 14\%$ ). Em termos prognósticos a sobrevida em pacientes com o subtipo luminal A é de 85% ao longo de cinco anos. Diversos fatores contribuem para que estes tumores sejam menos agressivos, incluindo: um menor potencial de proliferação celular, o que é confirmado por baixos níveis de marcação da proteína Ki67; baixo grau tumoral, com células tumorais mais diferenciadas; e boa resposta ao tratamento endócrino. Tumores luminais B correspondem entre 20 e 30% dos casos de câncer de mama invasivo, que somados aos luminais A, representam quase a totalidade dos casos (~80%). Nos luminais B são observadas marcações positivas para ER ( $\geq 1\%$ ), podendo ser negativo ou apresentar menos de 20% de marcação para PR, e negativo ( $\leq 10\%$ ) ou positivo ( $> 10\%$ ) para HER2. Já os níveis de Ki67 são iguais ou superior a 20% de marcação, o que confere a estes tumores maior taxa proliferativa que os luminais A. A sobrevida em cinco anos de pacientes com câncer de mama luminal B é de 70 a 80%, apresentando um prognóstico intermediário ao considerar todos os subtipos. O grau histológico é classificado como moderado (grau II) e são responsivos à endocrinoterapia e quimioterapia (Figura 3) (CHO, 2016; FRAGOMENI; SCIALLISS;

JERUSS, 2018; GOLDHIRSCH et al., 2013; VUONG et al., 2014; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

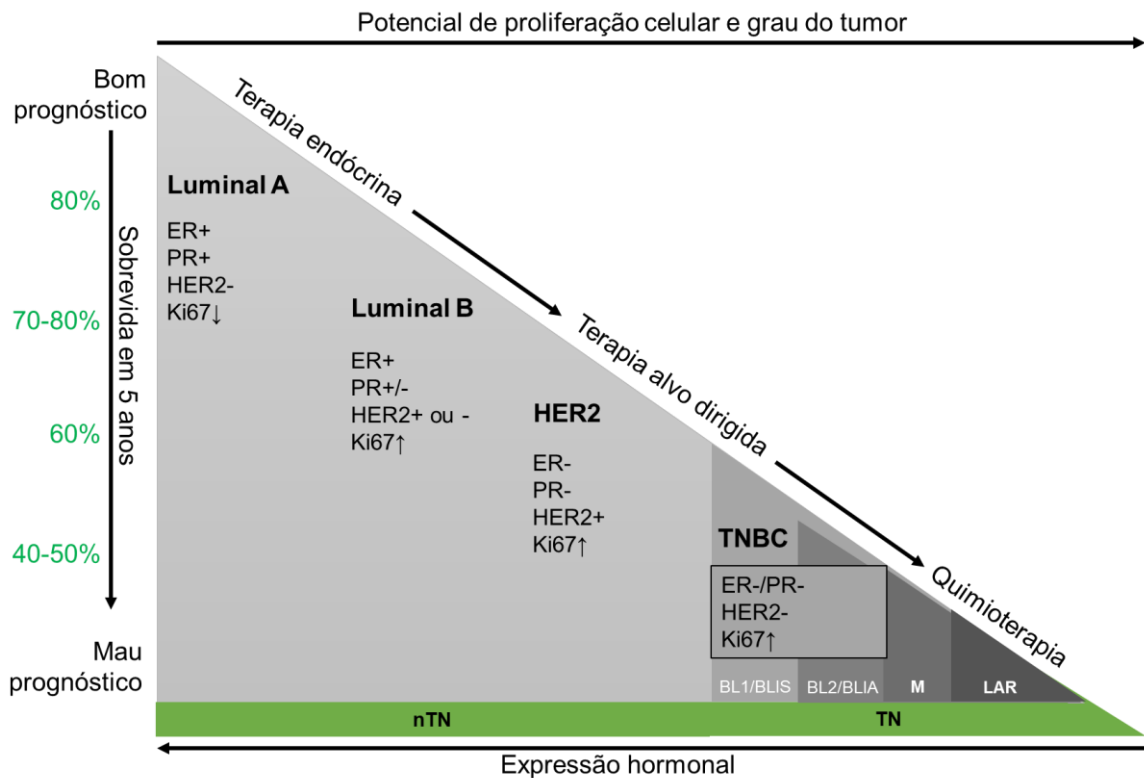
O subtipo HER2 tem menor frequência que os luminais, constituindo de 10 a 20% do total de cânceres de mama. Pela IHC são negativos para ER (<1%) e PR (<20%), positivos para HER2 com mais de 10% das células marcadas, acompanhados de alta expressão de Ki67 (>20%). Na técnica citogenética de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) são identificadas amplificações de HER2, o que pode levar à superexpressão do gene. Observa-se no subtipo HER2 um prognóstico ruim, com sobrevida em cinco anos de 60%. Apresentam grau histológico 3, onde as células tumorais são pouco diferenciadas (Figura 3). Pacientes com tumores HER2 positivos têm mau prognóstico ainda que beneficiadas por terapias dirigidas como no uso do trastuzumab e lapatinib (CHO, 2016; FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018; GOLDHIRSCH et al., 2013; VUONG et al., 2014; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Por fim, o câncer de mama triplo-negativo (TNBC) ou simplesmente triplo negativo (TN), cuja frequência varia entre 15 a 20% dentre os casos de cânceres de mama. Esses pacientes possuem tumores negativos para o ER (<1% de marcação), PR (<20% de marcação) e HER2 ( $\leq$ 10% de marcação), além de alta marcação para Ki67 (>30%) (Figura 3). Possuem um prognóstico ruim com sobrevida em cinco anos entre 40 e 50%. O grau histológico é comumente do nível 3 e não existem terapias alvo dirigidas capazes de contemplar essa população. Pacientes com esses tumores podem ser tratados com quimioterapia e inibidores de PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*), sendo o segundo aplicado na presença de mutação de *BRCA1* (CHO, 2016; FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018; GOLDHIRSCH et al., 2013; VUONG et al., 2014; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). A quimioterapia utilizada em casos de TNBC é semelhante, independentemente do estágio tumoral e cerca de 80% dos pacientes não apresentam resposta clínico-patológica completa, podendo-se observar alto índice de recorrência e metástase à distância (HAFFTY et al., 2006; JHAN; ANDRECHEK, 2017; SHANG et al., 2018).

Ainda que os inibidores de PARP e quimio sejam aplicados, o cenário prognóstico para estes pacientes continua ruim, com diferentes perfis de respostas aos tratamentos convencionais. As diferentes respostas aos tratamentos terapêuticos usuais associados à presença de mutações em genes de vias canônicas celulares, conferem aos TN um comportamento biológico distinto com impacto direto na sobrevida global. Por isso, subtipos dentro deste grupo foram sugeridos. A

classificação de Lehmann e colaboradores (2011) inicialmente sugeriu a existência de seis subtipos de TN. No entanto, em outro trabalho do grupo, as análises foram refinadas apontando para quatro subtipos distintos. Os subtipos imunomoduladores (IM) e mesenquimal *steam-like* (MSL), elencados no primeiro trabalho, foram excluídos em função de contaminantes. Os autores atribuem o surgimento desses dois subtipos devido ao infiltrado linfocitário e às células estromais, que após refinamento não foram mais identificados. Desse modo os subtipos encontrados nos tumores TN foram classificados em Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), mesenquimal (M) e luminal com receptor de andrógeno (LAR) (LEHMANN et al., 2011, 2016). Alternativamente, o trabalho de Burstein e colaboradores (2015) definiu subtipos de TN como: basal-like imunossuprimidos (BLIS), caracterizado pela regulação negativa de vias das células B, T e *natural killers* e vias de citocinas, com baixa expressão de moléculas que controlam a apresentação de antígenos, diferenciação e comunicação de células imunes e adaptativas. O subtipo BLIS é o que apresenta pior prognóstico; basal-like imuno-ativados (BLIA), ao contrário de BLIA, se caracteriza pela regulação positiva das vias imunológicas e possui melhor prognóstico. Os subtipos M e LAR se sobrepõem ao identificado por Lehmann (2016). Nos tumores LAR há expressão de ER embora sejam negativos na IHC para o receptor ER alfa, há ainda a expressão de receptor de prolactina e Erb4. O subtipo M está relacionado com alteração de vias moleculares clássicas no câncer de mama, como reparo e ciclo celular e vias de sinalização hereditária. Esse subtipo foi descrito previamente como *clowdin-low*, expressando genes exclusivos de osteócitos, adipócitos e fatores de crescimento do tipo IGF-1 (BURSTEIN et al., 2015).

Já a classificação TNBC/nTNBC ou TN/nTN não possui uma aplicação clínica, embora tenha sido utilizada em termos de pesquisa com o objetivo de encontrar novos alvos terapêuticos ou mesmo na compreensão da tumorigênese dessa população (Figura 3). O grupo de TNBC/TN compreende somente os tumores negativos para ER, PR e HER2, enquanto os nTNBC/nTN é composto pelos subtipos luminais e HER2 (Figura 3) (SANTUARIO-FACIO et al., 2017).



**Figura 3.** Classificação molecular do câncer de mama. ER: receptor de estrógeno. PR: receptor de progesterona. HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo II. Ki67: marcador de proliferação celular Ki67. TNBC: câncer de mama triplo-negativo. nTN: não triplo-negativo. TN: triplo-negativo. ER: receptor de estrógeno. PR: receptor de progesterona. HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. TNBC: câncer de mama triplo-negativo. BL1: basal-like 1. BLIS: basal-like imunossuprimido. BL2: basal-like 2. BLIA: basal-like imuno-ativado. M: mesenquimal. LAR: luminal com receptor de andrógeno. Imagem recriada pelo autor com adicional de informações baseadas nos trabalhos de (BURSTEIN et al., 2015; CHO, 2016; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018; LEHMANN et al., 2016; VUONG et al., 2014; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

Ainda que as classificações com base em expressão gênica, como por cDNA *microarray*, tenham sido de enorme significância para o entendimento da progressão desses tumores, a sólida categorização histopatológica é que direciona a conduta terapêutica das pacientes. Com base na expressão por cDNA *microarray*, por exemplo, uma parcela de tumores luminiais e uma pequena quantidade de casos HER2 enriquecidos e basal-like, são classificados clinicamente como ER positivos, o que a partir da primeira análise inviabiliza que o paciente seja um candidato a hormonioterapia (Figura 4). Por outro lado, se considerado apenas o perfil transcricional, uma parcela dessas pacientes deixaria de ser candidata a essa mesma modalidade terapêutica. Nesse sentido, ainda que exista alta sobreposição, como entre o basal-like e TNBC em 75%, a conduta clínica continua se pautando em resultados histopatológicos (ALEXANDROU et al., 2019; ZAGAMI; CAREY, 2022a).





**Figura 4.** Subreposição subtipo intrínseco e clínico do câncer de mama. Dentro de cada subtipo clínico existem vários subtipos moleculares. ER: receptor endócrino; TNBC: câncer de mama triplo-negativo; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. Adaptado de (ZAGAMI; CAREY, 2022a).

Nos diversos estudos acima abordados é notório o foco investigacional alavancado pela heterogeneidade molecular dos TNBC. Apesar de objetivos distintos, essas classificações possuem um apoio parcial entre si, apresentando considerável sobreposição (MILIOLI et al., 2017). Desse modo, a pesquisa por novos biomarcadores com capacidade de auxiliar na distinção de subtipos, com impacto prognóstico ou com importância terapêutica, continua em evidência nas pesquisas por todo o mundo (NAGINI, 2017). Dentre os inúmeros possíveis biomarcadores, proteínas que participam a montante e a jusante à via de sinalização WNT aparecem como promissoras, tanto no entendimento da carcinogênese, quanto como potenciais alvos para combater o câncer (ANASTAS; MOON, 2013).

### 1.3 Via de sinalização WNT

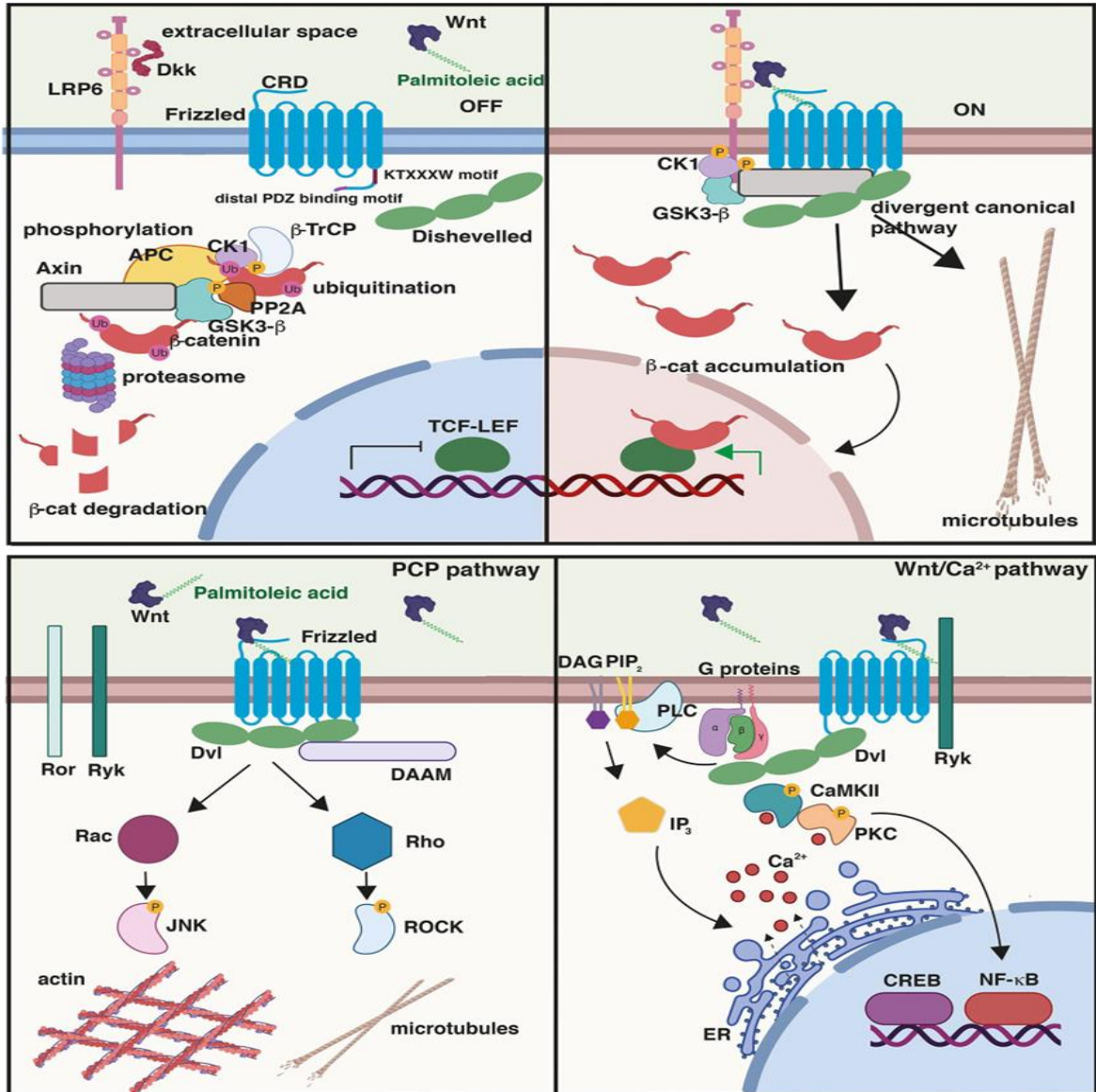
Durante a embriogênese, a via Wnt desempenha um papel determinante na formação do eixo embrionário, atua na orientação do axônio, na remodelação do sistema nervoso central e também na formação de órgãos como os pulmões e rins (KEMP et al., 2007; YANG, 2012). Na vida adulta, a via Wnt participa de processos homeostáticos de diversos tecidos (LIM; NUSSE, 2013). Sendo abrangente os órgãos

em que a via Wnt exerce alguma função, é notável que desregulações possam resultar em doenças, incluindo o câncer (DUCHARTRE; KIM; KAHN, 2016; POLAKIS, 2012).

A sinalização Wnt inclui 19 ligantes até hoje conhecidos (Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16). Esses ligantes são glicoproteínas que reconhecem o domínio rico em cisteína dos *Frizzled* (FZD). Os FZD compõem uma família de dez integrantes: FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10. Outro importante membro da via de sinalização Wnt são as proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP), conhecidos como co-receptores junto aos FZD. Dois LRP são descritos na literatura: LRP5 e LRP6 (TEPEKOY; AKKOYUNLU; DEMIR, 2015; WODARZ; NUSSE, 1998).

A via Wnt se divide em canônica e não canônica. Na ausência de ligantes circulantes externos à membrana celular, não há transdução de sinal, fazendo com que a via permaneça inativa (Figura 5A). Na via canônica ativada, ocorre o acoplamento de proteínas Wnt nos receptores FZD e LRP, levando a uma mudança estrutural destes. A *Dishevelled* (Dvl ou Dsh) é recrutada para a região citoplasmática, resultando na interação entre a Axin e o LRP. Em seguida, o complexo formado pela *glycogen synthase kinase 3  $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ), *casein-kinase 1* (CK1), AXIN e *Adenomatous polyposis coli* (APC), é recrutado. O recrutamento desse complexo permite que a  $\beta$ -catenina se acumule no citoplasma e migre para o núcleo onde atuará na transcrição de fatores LEF/TCF (Figura 5B) (HARB; LIN; HAO, 2019). A via não canônica atua de modo independente de  $\beta$ -catenina. Até agora, a sinalização não canônica tem sido subdividida em via Wnt cálcio-dependente (Wnt/Ca<sup>2+</sup>) (Figura 5C) e via de polaridade celular planar (PCP) (Figura 5D).

Em cânceres humanos são observadas alterações em múltiplas etapas da cascata de sinalização Wnt, incluindo alterações genéticas e epigenéticas, em níveis transcricionais ou pós-transcricionais. Modificações no padrão de expressão das glicoproteínas Wnt são comumente reladas na literatura (CHEN et al., 2018; SAITOH; KATOH, 2002). Também são descritas desregulações a jusante da ligação do Wnt, como nos receptores de membrana Frizzled (ZENG; CHEN; FU, 2018), Dsh (PULVIRENTI et al., 2011), GSK3 $\beta$  (SHAKOORI et al., 2005), CK1 (KNIPPSCHILD et al., 2005), APC (FODDE, 2002), Axin (MAZZONI; FEARON, 2014), NFAT (MEDYOUF; GHYSDAEL, 2008), JNK (SEMBA et al., 2020), e  $\beta$ -catenina, induzindo o aumento ou diminuição da atividade da via (WANG; LI; JI, 2021).



**Figura 5.** Via de sinalização Wnt canônica e não canônica. *Parte superior esquerda:* via inativa. Na ausência de um ligante Wnt, o FZD e LRP5/6 não são ativados. Desse modo o complexo formado pela GSK3 $\beta$ , CK1, APC e Axin permanece livre para fosforilar a  $\beta$ -catenina, que por sua vez será reconhecida pela  $\beta$ -TrCP e marcada para degradação proteossômica. *Parte superior direita:* via canônica ativada. Na presença da glicoproteína Wnt, o FZD e seu co-receptor LRP5/6 são ativados, recrutando a Dsh e o complexo GSK3 $\beta$ . Na ausência da atividade desse complexo, há o acúmulo de  $\beta$ -catenina citoplasmática que migra para o núcleo e promove a transcrição de cofatores TCF/LEF. *Parte inferior esquerda:* via não canônica de polaridade celular planar. O receptor FZD é ativado por meio do ligante. A Dsh é recrutada e forma um complexo com a DAAM e distintos mecanismos podem ocorrer: ativação de Rac e consequente ativação de JNK, resultando em reorganização dos filamentos de actina; ou DAAM pode ativar Rho que age sobre ROCK levando a modificações de microtubulos. *Parte inferior direita:* via não canônica Ca<sup>2+</sup> dependente. Após o ligante se acoplar, Dsh é recrutada pela mediação de uma proteína-G. Isso regula uma série de sinalizações *downstream*, com ativação de IP<sub>3</sub> e liberação reticular do Ca<sup>2+</sup>, que por sua vez ativa CamKII, regulando NF-KappaB. Adaptado de (PASCUAL-VARGAS; SALINAS, 2021).

Assim como em outros tecidos, a sinalização Wnt exerce papéis essenciais sobre as células tronco mamárias, atuando desde o desenvolvimento embrionário até

a vida adulta e gravidez (VAN AMERONGEN; BOWMAN; NUSSE, 2012). Importantes modulações dessa via de sinalização, canônica ou não canônica, têm sido associadas com os TNBC, participando de processos tumorigênicos e da própria metástase (DE et al., 2016; HAN et al., 2018; POHL et al., 2017).

Mutações e outros eventos podem levar ao aumento de  $\beta$ -catenina, que por sua vez tem sido associado com a progressão dos TNBC, além de recidivas tumorais, resistência terapêutica e menor sobrevida (WANG et al., 2017a). O acúmulo de  $\beta$ -catenina pode ainda ser favorecido mediante a inativação do supressor tumoral p53 - frequentemente mutado nessas pacientes. O p53 é capaz de regular a atividade oncogênica mediada pela  $\beta$ -catenina. Nesse sentido, alterações que resultam em prejuízos da ação de p53 permitem que  $\beta$ -catenina exerça seu papel oncogênico (DAMALAS et al., 2001).

#### 1.4 FZD9

As proteínas da família Frizzled são provenientes de regiões genômicas distintas que codificam sequências entre 500 a 700 aminoácidos. Além de domínios conservados, os membros dessa família atuam como receptores de membrana e a transpassam sete vezes. A região extracelular aminoterminal apresenta um domínio rico em cisteína (CRD) e em seguida uma região hidrofóbica composta por 40 a 100 aminoácidos (WANG et al., 1996). A região intracelular, carboxiterminal é caracterizada por alta variabilidade entre os próprios componentes da família frizzled, tendo em comum apenas o motivo KTXXXW (lisina-treonina-X-X-X-triptofano). Esse motivo está localizado 2 aminoácidos após o sétimo domínio hidrofóbico que atravessa a membrana e é essencial no processo de ativação da via  $\beta$ -catenina dependente. Nessa porção, ocorre a interação com o domínio PDZ de membros da família Dishevelled (Dvl) e subsequentemente o recrutamento das proteínas associadas ao complexo de degradação da  $\beta$ -catenina (UMBHAUER, 2000). Alguns membros dessa família FZD estão associados com mecanismos celulares de grande importância biológica como proliferação, progressão e invasão celular e metástase (AMIN; VINCAN, 2012; DUCHARTRE; KIM; KAHN, 2016).

O *Frizzled class receptor 9* (FZD9) é um dos representantes frizzled presente tanto na via Wnt canônica quanto na não canônica. Ele está localizado no cromossomo 7q11.23, conta com somente 1 éxon e codifica para uma proteína de 591

aminoácidos (64,5kD) (WANG et al., 1997). Sua região cromossômica é conhecida devido a síndrome de Williams-Beuren. Os pacientes com essa síndrome possuem uma deleção que abrange entre 1,55 a 1,8Mb, o que resulta na perda de genes importantes, como FKBP6, FZD9, STX1A, ELN, LMK1, CYLN21, GTF21 e NCF1. A deleção heterozigótica do FZD9 aparece como um provável contribuinte para manifestação da síndrome de Williams (CHAILANGKARN et al., 2016). Em uma análise filogenética que utilizou o alinhamento *ClustalW*, o FZD9 aparece com maior proximidade ao FZD10 e ambos dividem um ponto de divergência comum com o FZD4 (HUANG; KLEIN, 2004).

De acordo com dados do GTEx, o FZD9 está expresso predominante no cérebro, músculo esquelético, olhos, rins e testículos. A expressão moderada pode ser encontrada no córtex adrenal, intestino delgado, pâncreas e estômago. As principais funções moleculares do FZD9, segundo dados do Gene ontology (GO) incluem a transdução de sinal, atividade como receptor de sinal em membrana, regulação de glicoproteínas Wnt e capacidade de homo e heterodimerização. Dentre os processos biológicos estão a ossificação, liberação de citocromo C pela mitocôndria, transdução de sinal, desenvolvimento do sistema nervoso, diferenciação de células B, regulação positiva/negativa da apoptose, regulação de níveis citosólicos do cálcio, dentre outros (HACHIM et al., 2020; HEILMANN et al., 2013; LEE et al., 2022).

Poucos estudos até o momento têm avaliado a função de FZD9. O trabalho de Karasawa (2002) demonstrou uma regulação de FZD9 mediada por Wnt2. Para isso, o grupo realizou a indução da expressão de Rfz9 (*frizzled class receptor 9 - Rattus norvegicus*) e observou hiperfosforilação e realocização da Dvl1 do citoplasma para a membrana celular. Além disso, a co-transfecção com diferentes glicoproteínas demonstrou que apenas com o Wnt2 induziu ao aumento da atividade de Rfz9. Em análise por *Western-Blot*, a co-transfecção Rfz9/wnt2 induziu maior aumento de níveis de  $\beta$ -catenina. Nesse sentido, o trabalho de Karasawa aponta para uma atividade canônica na via Wnt sendo mediada pelo FZD9 (KARASAWA et al., 2002).

Zhang e colaboradores (2006), analisando uma coorte composta por 35 amostras provenientes de pacientes com astrocitoma, observaram um progressivo aumento dos níveis de FZD9 em função do grau tumoral. Além disso, foi demonstrada uma correlação positiva com Ki67, um importante marcador de proliferação tumoral ( $r=0.77$ ,  $p<0.0001$ ) (ZHANG et al., 2006). Rahman e colaboradores (2008) observaram

aumento da expressão de FZD9 após indução de angiogênese em células de córion humano (ABDUL RAHMAN et al., 2008). Em osteosarcoma, foi demonstrado que altos níveis de c-Fos, Wnt2 e Fzd9 estão associados com estágios tumorais mais avançados. Foi observado ainda que mudanças na expressão de c-Fos resultam em alterações dos níveis de Wnt2 e Fzd9 (WANG et al., 2017b).

Por outro lado, os estudos de FZD9 em câncer de pulmão têm sugerido uma função supressora relacionada ao Wnt7a (SMITH et al., 2022; WINN et al., 2005). Suportando essa ideia, o trabalho de Winn e colaboradores (2005) observou que após restaurar a expressão de Wnt7a em linhas celulares de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) houve uma reversão da transformação maligna celular com inibição do crescimento e maior capacidade de diferenciação das células. Esse processo é dependente da presença do FZD9, o que foi comprovado pelo grupo em ensaio de imunoprecipitação (WINN et al., 2005). Por um mecanismo não totalmente elucidado, Wnt7a ativa FZD9, o que resulta na regulação de PPARG (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) que por sua vez regula os níveis de NF-KappaB (*nuclear factor kappa B*), levando a um efeito anti-tumorigênico (SMITH et al., 2022; SOMPEL et al., 2022; WINN et al., 2005).

Os poucos trabalhos disponíveis na literatura apontam para uma atividade pleiotropica, sendo não apenas no contexto de ligante-dependente, mas dependente ainda do tipo celular e microambiente envolvido. Os trabalhos tem mostrado a proteína FZD9 altamente expressa em câncer gástrico, osteosarcoma, astrocitoma, carcinoma hepatocelular, insulinoma e câncer cervical, enquanto a baixa expressão foi relacionada com leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão de não pequenas células (Tabela 1). No caso do câncer de mama, os diferentes subtipos apontam para distintos comportamentos, enquanto a metilação está associada ao perfil de pacientes receptores hormonais positivos (CONWAY et al., 2014), o que indicaria uma baixa expressão. Nos subtipos basais, o trabalho de Hachim e seus colegas apontam uma alta expressão de FZD9 (HACHIM et al., 2020).

**Tabela 1.** Estudos disponíveis na literatura com descrição da expressão de FZD9.

<b>Tipo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Autor</b>
Câncer gástrico	Superexpresso	(KIRIKOSHI; SEKIHARA; KATOH, 2001)
Osteosarcoma	Superexpresso (IHQ)	(WANG et al., 2017b)
Astrocitoma	Superexpresso (IHQ)	(ZHANG et al., 2006)
Carcinoma hepatocelular	<i>Knockdown</i> de FZD9 inibiu proliferação e motilidade celular	(TOMIZAWA, 2009)
Insulinoma	FZD9 e MYC são necessários para tumorigênese	(ZACARÍAS-FLUCK et al., 2021)
Câncer de mama (Basal-Like/TNBC)	Superexpresso (análise IHQ)	(HACHIM et al., 2020)
Câncer cervical	Superexpresso em linhagens	(RAMOS-SOLANO et al., 2015)
Leucemia mieloide aguda	Hipoexpresso/metilação	(ZHANG et al., 2016)
Câncer de pulmão de células não pequenas	Hipoexpresso	Smith et al, 2022; Winn et al, 2006

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Analisar o papel prognóstico e terapêutico de FZD9 em amostras de mulheres com câncer de mama.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar genes diferencialmente expressos entre população de pacientes com câncer de mama triplo-negativo e tumores não triplo-negativos.
- Validar por meio de ferramentas *in silico* a reprodutibilidade do perfil de FZD9.
- Analisar o perfil de FZD9 em amostras de câncer de mama de mulheres brasileiras por meio de análise histopatológica.
- Caracterizar o perfil transcricional de FZD9 em linhagens celulares representativas de tecido mamário.
- Analisar as alterações transcricionais de FZD9 após tratamento com tricostatina e 5-aza-2'deoxyctidine (decitabina).
- Avaliar os efeitos da inibição de FZD9 por iCRISPR/Cas9 na formação de colônias, capacidade de duplicação das células e migração.

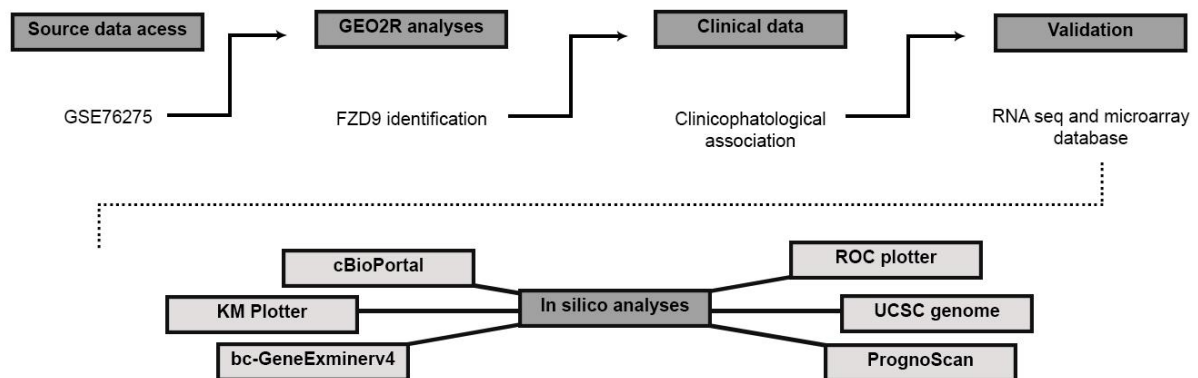


### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Análises *in silico*

##### 3.1.1 Acesso ao *Geo database*

O conjunto de dados GSE76275 cDNA *microarray* (*Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*) (BURSTEIN et al., 2015) da plataforma *Geo database* ([ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) foi acessado e analisado por meio da ferramenta online GEO2R ([ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r](http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r)). Trata-se de uma coorte composta por 265 pacientes, sendo 198 amostras provenientes de câncer de mama triplo-negativo e 67 não triplo-negativo. O critério de seleção do gene para posterior análise foi o p-valor ajustado por Benjamini e Hochberg (False Discovery rate)  $<0,001$  e relevância biológica observada por associação prognóstica tanto em câncer de mama geral quanto no subtipo triplo-negativo. A identificação do FZD9 e ferramentas de validação estão esquematizados na Figura 6.



**Figura 6.** Desenho metodológico da análise *in silico*. Desenho metodológico descrevendo o protocolo do estudo e as principais bases de dados utilizadas para identificação, análise e validação *in silico* do perfil de expressão de FZD9. ROC: *Receiver operating characteristic*; UCSC: Universidade da Califórnia em Santa Cruz; KM: Kaplan-Meier.

##### 3.1.2 Análise de expressão

O *Breast Cancer Gene-Expression Miner v4.4* (bc-GenExMiner v4.4) ([bcgenex.centregauducheau.fr/BC-GEM/GEM-requete.php](http://bcgenex.centregauducheau.fr/BC-GEM/GEM-requete.php)) é uma ferramenta on-line de mineração de dados transcriptômicos provenientes de diversas fontes devidamente anotadas (JÉZÉQUEL et al., 2012, 2013). Usamos os dados de RNA-seq para analisar

a expressão de FZD9 com parâmetros clínicos como ER, PR, HER2 e diferentes subtipos clínicos de câncer de mama.

### **3.1.3 Análise de sobrevivência**

O papel prognóstico de FZD9 foi analisado usando o Kaplan-Meier Plotter ([kmplot.com/analysis/](http://kmplot.com/analysis/)) para criar as curvas de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de recaída (RFS) (GYÖRFFY et al., 2010). A expressão de FZD9 em pacientes com BC foi classificada como alta ou baixa com base em seu nível de expressão mediano. Apenas uma sonda validada foi selecionada com base nos critérios de seleção automática do melhor valor de corte.

### **3.1.4 Dados do cBioPortal**

cBioPortal (<https://cbioportal.org>) é um banco de dados on-line e multifuncional que contém a expressão gênica e outras características de diferentes tipos de câncer provenientes de vários estudos (CERAMI et al., 2012; GAO et al., 2013). No presente trabalho, acessamos a expressão FZD9 de 1.108 casos com dados de RNA seq V2 RSEM do conjunto de dados *Firehouse*. As informações clínicas foram cruzadas com dados de expressão quantitativa. A variável qualitativa para associações e estatísticas de correlação foi realizada a partir da mediana extraída de todo o conjunto de dados. As amostras foram classificadas em baixo quando expressão de FZD9 inferior ao valor da mediana e alto quando superior à mediana.

### **3.1.5 Análise de Plotter ROC**

O ROC Plotter é uma ferramenta on-line de fácil utilização (FEKETE; GYÖRFFY, 2019). Com dados transcriptômicos de 3.104 pacientes com câncer de mama tratados e não tratados com terapia endócrina, terapia anti-HER2 ou quimioterapia. Avaliamos o padrão de expressão de FZD9 diante do tratamento recebido pelo paciente.

## **3.2 Análise de espécimes biológicos e estudos *in vitro***

### **3.2.1 Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão Interna de Biossegurança**

O estudo do FZD9 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com o parecer de número 4.995.205 (Anexo 1). Uma emenda foi adicionada para fins de utilização de material biológico. O material biológico fora coletado e aprovado para estudo anterior (parecer de número 797.466) que visava identificar e caracterizar novos biomarcadores em câncer de mama. A emenda teve o objetivo de alterar o nome original do estudo e incluir tecnologia para análise imuno-histoquímica do FZD9, obtendo aprovação com o parecer de número 5.754.913 pelo CEP HCFMUSP (Anexo 2).

A aprovação pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia e Oncologia foi concedida ao protocolo de número 140/2021 (Anexo 3).

### **3.2.2 Validação e análise imuno-histoquímica**

As reações de imuno-histoquímica (IHQ) foram realizadas no sistema automatizado VENTANA BenchMark GX System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Para detecção da proteína alvo, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-FZD9 produzido em coelho (PA5-27119; ThermoFisher; cedido pela Rennova Innovapharma) na concentração de 1:500. As reações positivas foram visualizadas com um coquetel contendo anticorpos secundários anti-coelho conjugados com peroxidase utilizando o kit UltraView Universal 3,3'-Diaminobenzidine Detection (Ventana Medical Systems, Inc, Roche, Tucson, Arizona) de acordo com as instruções do fabricante. Tecidos para controles positivos e negativos foram utilizados em cada reação realizada. As lâminas de TMA foram lidas e diagnosticadas por patologista experiente. Foi avaliado a intensidade e extensão da marcação de FZD9. Para definição do *score*, foi realizada média da intensidade e média da extensão de cada triplicata. A média de intensidade foi multiplicada pela média da extensão. Foram consideradas positivas amostras cujo *score* fosse superior a 1,0.

### 3.2.3 Cultura de células em monocamada

As linhagens celulares BT-549 (ATCC® HTB-122™), MDA-MB-453 (ATCC® HTB-131™), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) e HCC70 (CRL-2315™) derivadas de tumores de mama triplo-negativos e gentilmente cedidas pela Dra. Maria Cristina Rodrigues Rangel, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Gaithersburg, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Gaithersburg, EUA). A linhagem celular MCF10A, proveniente de células epiteliais de tecido mamário normal (sem tumor) foi cultivada na proporção de 1:1 nos meios de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): F12 (Ham's Nutrient Mixture) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco, Gaithersburg, EUA), 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 10,0 µg/mL de insulina, 0,02 µg/mL de EGF e 0,1 µg/mL de toxina colérica. A linhagem MDA-MB-468 foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. A linhagem HS578T foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB. A linhagem celular derivada de colo uterino HeLa (adenocarcinoma de cérvix uterina HPV18 positivo- ATCC® CCL-2™); foi cultivada em Minimum Essential Medium Eagle (MEM) suplementado com SFB 10%. Células HEK293T (células embrionárias de rim humano) foram cultivadas em DMEM com SFB 10%. As seguintes concentrações de antibióticos-antimicóticos (Gibco, Gaithersburg, EUA) foram utilizadas para ambos os meios: 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os meios de cultura foram mantidos em estufa (Thermo Electron Corporation, Marietta, EUA) a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4 Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR

Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme as instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas pelo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (ThermoScientific). Para análise de qualidade do RNA, foi utilizado 1µg de massa total e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 1%. Após verificação da qualidade, utilizou-se 2µg do RNA total para realização da transcrição reversa por meio do kit *high capacity cDNA reverse transcription* (Thermo Fisher). A amplificação qPCR foi realizada em triplicata. A normalização quantitativa do cDNA foi realizada em cada amostra,

utilizando a expressão do controle endógeno GAPDH. O  $2^{-\Delta\Delta CT}$  foi determinado a partir do  $\Delta CT$  de FZD9 em função do  $\Delta CT$  de GAPDH. O desenho dos primers utilizados na reação encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência dos oligos de repressão e de primers para análise da expressão do gene de interesse.

Gene		Sequência (5' - 3')	
<b>FZD9</b>	Promotor 1	Top	CACCGGGCTCCGGGAGGACACGCCC
		Bottom	AAACGGGCGTGTCTCCCGGAGCCC
	Promotor 2	Top	CACCGGGCTACCAGCCCCCGGGGCG
		Bottom	AAACCGCCCCGGGGGCTGGTAGCCC
	CDS 1	Top	CACCGCGGCGCGAACTCCGCTAGCT
		Bottom	AAACAGCTAGCGGAGTTCGCGCCGC
CDS 2	Top	CACCGTGGAGATCCCCATGTGCCG	
	Bottom	AAACCGGCACATGGGGATCTCCAC	
CDS 3	Top	CACCGCGGCGCGAACTCCGCTAGCT	
	Bottom	AAACAGCTAGCGGAGTTCGCGCCGC	
<b>WNT5A</b>	Primer	Forward	GTGGAGATCCCCATGTGCC
		Reverse	CCGAAGTTGAACTGCTCCAT
<b>WNT7A</b>	Primer	Forward	CTTTTGCACAATCACGCCCA
		Reverse	TTTCCAACGTCCATCAGCGA
<b>PPARG</b>	Primer	Forward	TTTCGGAAAGTGAGCCACCG
		Reverse	GCACAGGCCCGTGGAAATGATA
<b>GAPDH</b>	Primer	Forward	AGAAAACCAAGGGACCCGAA
		Reverse	GAGTGGCTTGCCCTTCACA
<b>U6</b>	Primer	Forward	GACTGTGGTCATGAGTCCTCCC
		Reverse	CAAGATCATCAGCAATGCCTCC
<b>U6</b>	Primer	Forward	GACTATCATATGCTTACCGT

### 3.2.5 Tratamento com TSA e 5-AZA

Células com alta expressão de FZD9 foram selecionadas para tratamento com tricostatina (TSA) e 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA). Para seleção da dose de medicamento foi realizado experimentos prévios em placa de 24 well e diferentes concentrações da droga com observações diárias e mesmas condições aplicadas ao experimento com a concentração de escolha. A definição da concentração se baseou na não alteração morfológica das células e ausência de mudanças no comportamento proliferativo após comparação com as respectivas células que não receberam o tratamento. Foram plaqueadas 10.000 células BT-549 e 60.000 células MDA-MB-453 em placa de 6 well. Após 24h deu-se início ao tratamento. A linhagem BT-549 foi tratada com 25nM de TSA e a MDA-MB-453 com 10nM. O tratamento com 5-AZA foi de 1,5µM em ambas as linhagens. O meio de cultura foi trocado todo dia, durante 7 dias, suplementado com TSA ou 5-AZA. RNA total e proteína foram extraídos transpassado uma semana de tratamento.

### 3.2.6 Desenho dos guides, transdução

Os guides (gRNAs) para a repressão do FZD9 foram desenhados a partir da estrutura genômica GRCh38/hg38 disponível no *Genome browser* (genome.ucsc.edu). A região de interesse para reprimir a expressão do FZD9 constituiu de 2 pares de guides para região promotora e 3 pares de guides para a CDS, utilizando para isso a ferramenta CRISPOR (crispr.mit.edu). Sequências acessórias foram inseridas em cada *guide* para o reconhecimento da enzima de restrição em reações subsequentes (Tabela 2).

Foi utilizado o plasmídeo comercial fornecido pela Addgene dCas9-KRAB-MeCP2 (Plasmid #122205) que apresenta um gene de resistência à blasticidina. Adicionalmente, o plasmídeo sgRNA(MS2)\_zeo\_backbone (Plasmid #61427), o qual contém gene de resistência a zeocina e foi utilizado para inserção do gRNA (guide). O objetivo do uso combinado desses vetores consistiu em reprimir a expressão de FZD9. A repressão pode ocorrer de modo sutil ou drasticamente a depender da região genômica de escolha e modelo celular.

Os diferentes pares de oligos (Tabela 2) foram submetidos à reação de fosforilação e anelamento e posteriormente diluídos 100 vezes. Os guides foram inseridos no plasmídeo (MS2)zeo\_backbone e 5uL do produto final foram utilizados para transformar 50uL de bactérias por meio de eletroporação (Eppendorf Eporator) a 1700 V. A recuperação foi realizada em meio SOC (ThermoFisher, 15544034) em agitador por 1 hora a 37°C. Em seguida, 50uL do produto recuperado foram plaqueados em agar LB contendo 100µg/mL de ampicilina. Após overnight, dez colônias foram coletadas e submetidas a uma PCR convencional, utilizando-se o primer da região promotora U6 do plasmídeo como forward e o oligo complementar do guide como primer reverso (Tabela 2). Confirmada a inserção do guide no vetor seguiu-se com a amplificação do vetor por meio do Miniprep (Sambrook, 2012) e purificação com o kit Reliaprep® (Promega).

Células HEK293T foram transfectadas utilizando o reagente Mission™ Lentiviral Pack Mix (Sigma-Aldrich), o qual é composto por um conjunto de vetores para a produção de lentivirus. Utilizou-se 26µL do reagente Mission, 16µL do reagente de transfecção Fugene®HD (Promega) e 2,6µg do vetor para o sistema CRISPR em placas de 6 poços. O meio destas células, contendo os vírus foram coletadas em 24, 48 e 72hs e armazenadas em tubo de polipropileno a -80°C até o

momento de uso.

As células foram transduzidas em dois momentos. No primeiro foi utilizado 2 µg/mL de polibreno e um MOI de 10 referente ao plasmídeo KRAB-MeCP2 e após 48hs deu-se início a seleção com 2,5µg/mL de blasticidina por 48hs. Após recuperação e expansão das células resistentes, essas foram plaqueadas com posterior transdução dos vírus contendo o gRNA. A seleção foi realizada com 200µg/mL de zeocina por 96hs.

### **3.2.7 Ensaio de *double time* celular**

O *double time* das células foi avaliado através de uma curva de crescimento, na qual 4 mil células por poço foram plaqueadas em uma placa de 24 poços, e após um dia, foram contadas em triplicata por 8 dias consecutivos, utilizando-se uma câmara de Neubauer. O resultado das contagens foi plotado em uma planilha e analisados no GraphPad Prisma.

### **3.2.8 Migração celular**

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de fechamento de ferida (wound healing). As células controles e nocauteadas foram crescidas em placas de cultura de 6 poços até atingirem a confluência. Em seguida, realizamos uma “ferida” ou descontinuidade na monocamada celular, utilizando para isso uma ponteira de pipeta. As células foram lavadas com PBS, e adicionado antimetabólico por 1 hora. Na continuidade, foram adicionados os respectivos meios suplementados sobre os poços da placa. Imagens fotográficas foram registradas, indicando o tempo inicial do ensaio (t=0). As células foram incubadas em estufa a 37°C e após 12, 24 e 48 horas foram realizadas novas lavagens e adição de meio de cultura seguido de captura de imagens em campos correspondentes ao tempo inicial. Para análise das imagens, utilizamos o software ImageJ e a área da ferida foi expressa em porcentagem, o decréscimo percentual da área da “ferida” a partir do tempo inicial (t=0) é o que caracteriza o índice de migração celular.



### 3.2.9 Formação de colônia

A formação de colônia em baixa densidade foi analisada através do plaqueamento de 200 células em placa de 6 wells. Após 7 dias de incubação para a formação das colônias as células foram submetidas à fixação com formaldeído 3,7% seguido de coloração com cristal de violeta. As colônias formadas foram quantificadas e a eficiência de formação de colônias foi avaliada por meio da fórmula: CFE (*colony-forming efficiency*) = número de colônias/ número de células plaqueadas X 100. O diâmetro das colônias foi avaliado por meio do software AxioVision v. 4.8.2.0 e calculado a área elíptica = raio maior X raio menor X  $\pi$ .

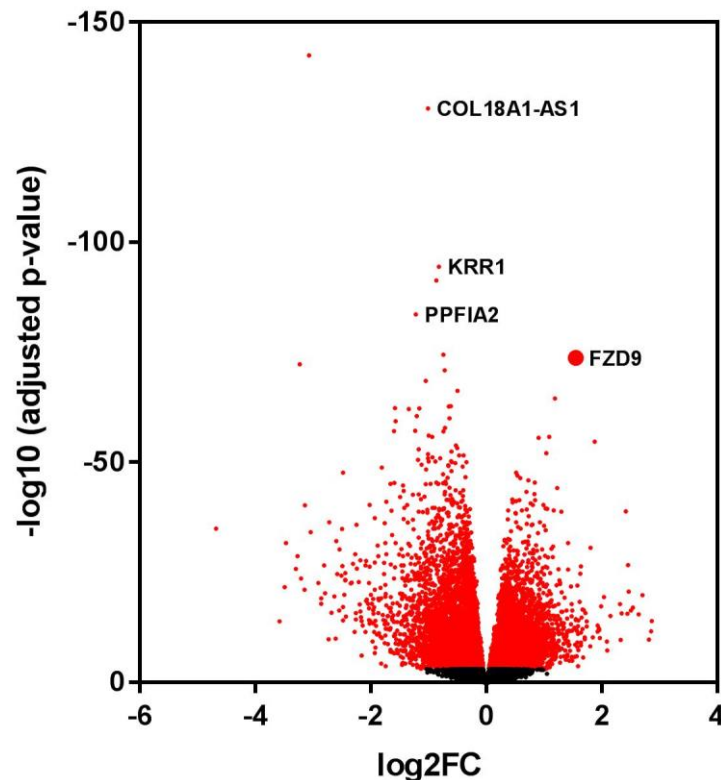
### 3.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA), os grupos foram avaliados conforme a observação da distribuição Gaussiana, sendo aplicados teste t ou ANOVA, teste não paramétrico de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis. Os resultados considerados significativos foram aqueles cujo valor p fosse menor que 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Geo database: identificação do FZD9

O conjunto de dados GSE76275 é derivado do estudo de Burstein e colaboradores (BURSTEIN et al., 2015) que visava identificar novos alvos em diferentes subtipos de TNBC a partir de análise por *microarray*. Os dados foram recategorizados e avaliado o perfil de expressão, considerando as 265 amostras de tumores de mama, das quais 198 foram classificadas como TN e 67 como tumores nTN com base nos marcadores clássicos de ER, PR e HER2. O presente estudo dividiu essas amostras em dois grandes grupos: TN e nTN, identificando uma lista composta por 54.675 sondas a partir da ferramenta online GEO2R (Figura 7).



**Figura 7.** Volcano plot contendo as sondas diferencialmente expressas representados em pontos vermelhos do lado esquerdo (down-reguladas) e vermelhos do lado direito (up-reguladas). Em preto com alta sobreposição corresponde às sondas sem diferenças em níveis de expressão na população analisada.

Os top 10 genes diferencialmente expressos com respectivos valores  $p$ , valores  $p$ -ajustados e *Log Fold Change* (LogFC) estão listados em ordem crescente na Tabela 3. Para definição do gene a ser estudado e validado, seguiu-se com análise de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de recidiva (RFS) em pacientes TNBC. Para

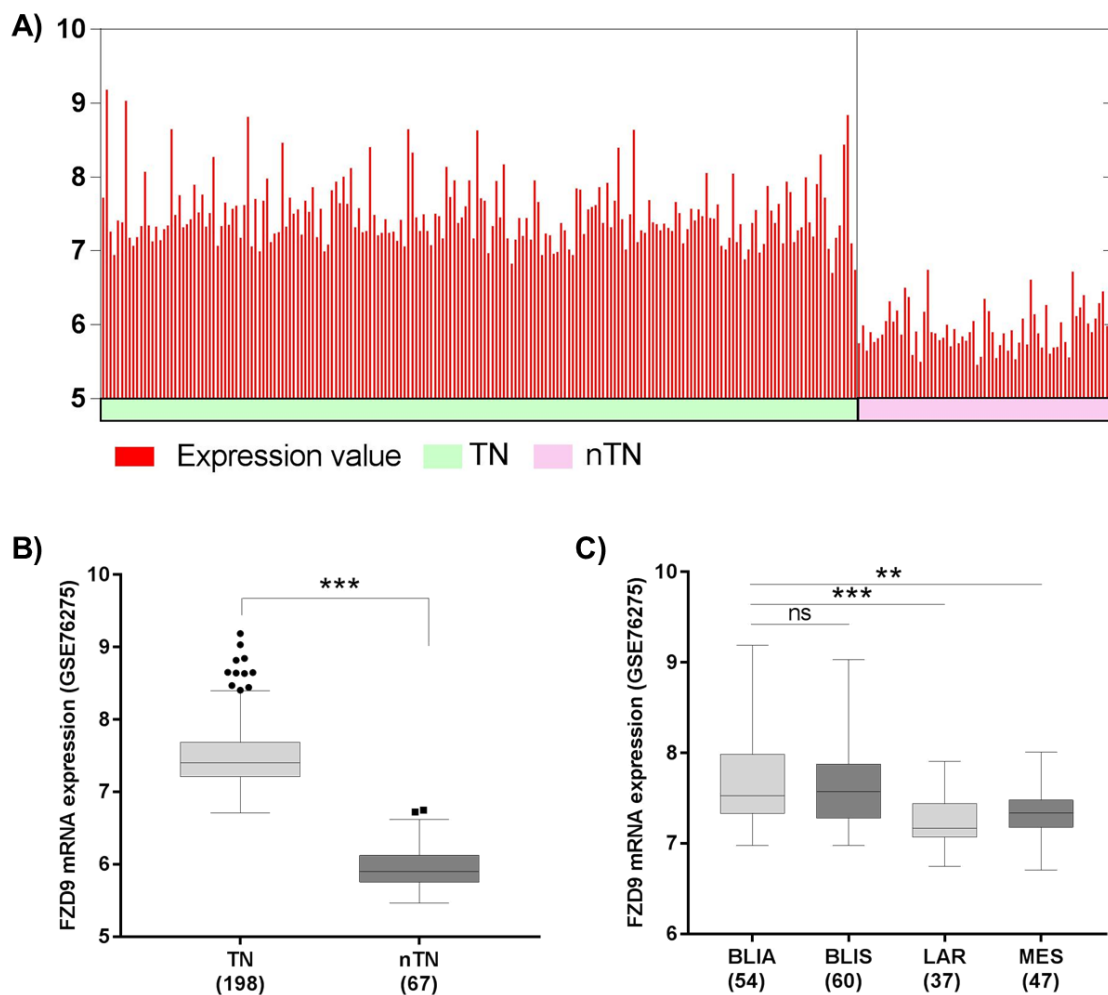
avaliar a sobrevida utilizou-se o ID das sondas detectadas diretamente no KM Plotter com ponto de corte estipulado pela mediana. O FZD9 corresponde à sétima sonda com o menor  $p$ -valor ajustado, seguido de associação significativa com OS e RFS e por isso foi escolhido para posteriores validações.

**Tabela 3.** Top 10 genes diferencialmente expressos entre TN e nTN após análise no GEO2R, utilizando o conjunto de dados GSE76275 e análise de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva a partir da ferramenta KM Plotter.

	<b>ID</b>	<b>p-valor ajustado</b>	<b>p-valor</b>	<b>logFC</b>	<b>Sigla</b>	<b>Nome completo</b>	<b>OS*</b>	<b>RFS**</b>
<b>1</b>	241662_x_at	3,47E-143	6,35E-148	-3.07	-	-	0,34	0,01
<b>2</b>	1564017_at	3,87E-131	1,41E-135	-1.015	COL18A1-AS1	COL18A1 <i>antisense</i> RNA 1	0,19	0,03
<b>3</b>	243930_x_at	3,44E-95	1,89E-99	-0.817	KRR1	KRR1, <i>small subunit processome component homolog</i>	0,30	0,69
<b>4</b>	243317_at	4,98E-92	3,64E-96	-0.863	-	-	0,17	0,10
<b>5</b>	232073_at	2,31E-84	2,11E-88	-1.219	PPFIA2	PTPRF <i>interacting protein alpha 2</i>	0,61	<0,01
<b>6</b>	243466_at	3,40E-75	3,73E-79	-0.741	-	-	0,47	0,72
<b>7</b>	207639_at	1,97E-74	2,52E-78	1.552	FZD9	<i>frizzled class receptor 9</i>	<0,01	<0,0001
<b>8</b>	243241_at	4,94E-73	7,23E-77	-3.234	-	-	0,27	0,22
<b>9</b>	239722_at	1,30E-71	2,14E-75	-0.721	C5orf49	<i>Chromosome 5 open reading frame 49</i>	0,88	0,47
<b>10</b>	239016_at	3,12E-69	5,70E-73	-1.052	-	-	0,06	0,04

\*Sobrevida global; \*\*RFS: Sobrevida livre de recidiva.

A fim de compreender o perfil de expressão desse transcrito, os valores individuais para FZD9 foram plotados, sendo evidenciado que todos nTN possuem um nível inferior em relação aos TN (Figura 8A). Essa diferença foi confirmada pelo teste *t-student*, evidenciando a alta expressão de FZD9 em pacientes com tumores de mama triplo-negativos ( $p < 0,0001$  ajustado; Figura 8B). Considerando os diferentes subtipos de TNBC avaliados por Burstein e colaboradores (2015) observamos que os tumores basal-like imunossuprimidos e imuno-ativados apresentaram maiores níveis de FZD9 comparados aos subtipos mesenquimal e LAR (Figura 8C).



**Figura 8.** Expressão de FZD9 no conjunto de dados GSE76275. A) Nível transcricional individual. Barra verde inferior representando os pacientes com tumores de mama triplo-negativos (TN) e em rosa representando os tumores de mama não triplo-negativos (nTN). B) Expressão de FZD9 na população de tumores TN e nTN. Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov e teste t de Student. C) Expressão de FZD9 considerando subtipos dos tumores TN. BLIA: Basal-Like imuno-ativado; BLIS: Basal-Like imunossuprimido; LAR: luminal com receptor de andrógeno; MES: Mesenquimal.

Além disso, observamos associações significativas entre as categorias de baixa e alta expressão de FZD9 e o status do tumor (TN vs nTN;  $p < 0,0001$ ), grau tumoral ( $p < 0,0001$ ) e também em relação aos subtipos TN identificados na coorte analisada ( $p < 0,0001$ ; Tabela 4).

**Tabela 4.** Características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama triplo negativo e não triplo negativo oriundas do banco de dados GEO GSE76275 e associação com a expressão de FZD9.

Parâmetros	Alto		Baixo		p-valor
	n	%	N	%	
<b>Idade</b>					
≤40	17	13,4	12	9,3	0,588
>40 ≤70	93	73,2	99	76,7	
>70	17	13,4	18	14,0	
<b>Status menopausal</b>					
Pós	6	5,5	15	13,0	0,106
Pré	64	58,2	67	58,3	
	40	36,4	33	28,7	
<b>Histologia</b>					
Adenocarcinoma/Carcinoma	2	1,5	5	7,6	0,107
IDC	127	96,2	61	92,4	
ILC	1	0,8	0	0,0	
Outro	2	1,5	0	0,0	
<b>Estadio</b>					
I	14	15,6	4	4,5	0,055
II	46	51,1	56	62,9	
III	29	32,2	28	31,5	
IV	1	1,1	1	1,1	
<b>Status nTN/TN</b>					
nTN	0	0,0	67	50,4	<0,0001
TN	132	100,0	66	49,6	
<b>Grau tumoral</b>					
Moderadamente diferenciado	28	24,8	51	52,0	<0,0001
Mal Diferenciado	84	74,3	43	43,9	
Bem diferenciada	1	0,9	4	4,1	
<b>Subtipos do triplo-negativo</b>					
Basal-Like Immune-Activated (BLIA)	44	33,3	10	15,2	<0,0001
Basal-Like Immune-Suppressed (BLIS)	46	34,8	14	21,2	
Luminal-AR (LAR)	12	9,1	25	37,9	
Mesenchymal (MES)	30	22,7	17	25,8	

IDC: carcinoma ductal invasivo. ILC: carcinoma lobular invasivo. TN: triplo-negativo. A expressão alta ou baixa foi classificada de acordo com o valor mediano de FZD9. Chi-quadrado ou Exato de Fisher foi aplicado.

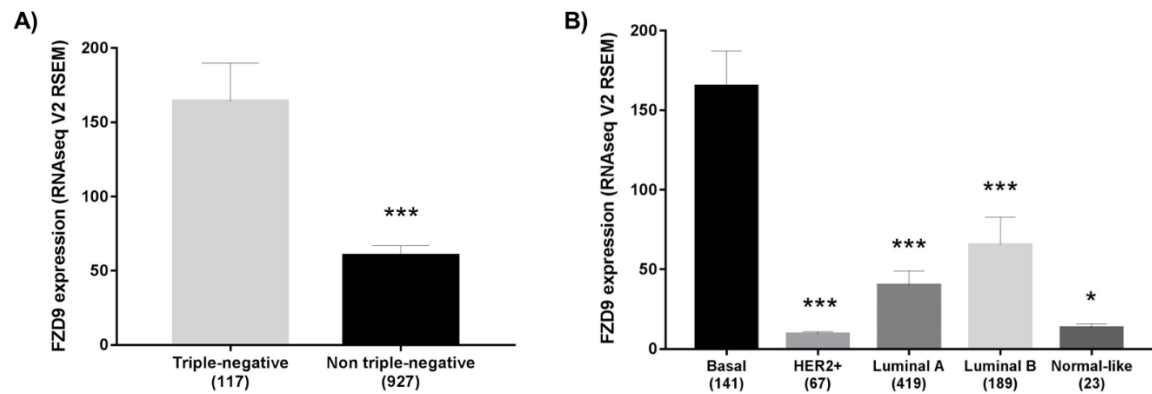
A fim de analisar a reprodutibilidade do padrão de expressão de FZD9 observado no grupo de identificação, duas populações com maior n amostral foram utilizadas. Inicialmente analisamos o perfil de FZD9 e possíveis associações

## **4.2 Validação *in silico* do FZD9**

### **4.2.1 The Cancer Genome Atlas (TCGA)**

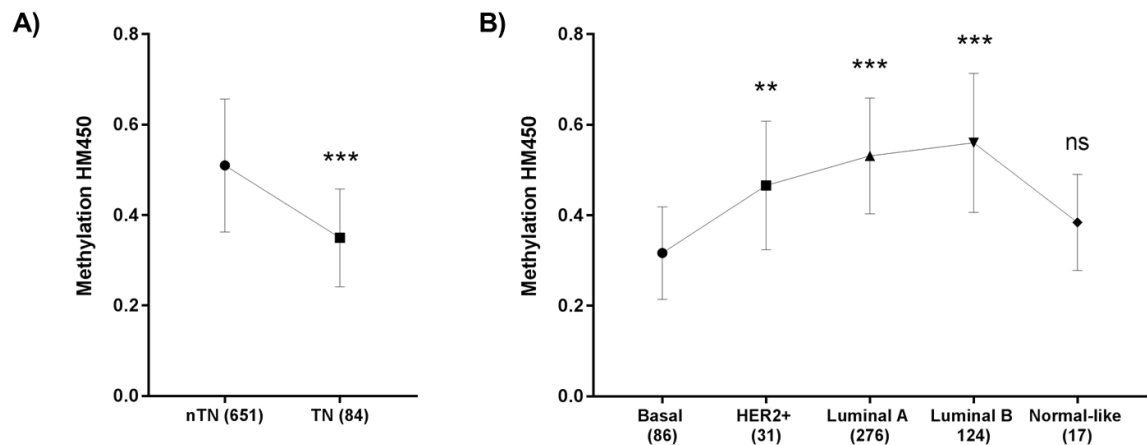
A análise a seguir revelou que tumores basais e/ou tumores TN têm um padrão de expressão distinto dos outros subtipos tumorais. Após classificar os tumores como TN e nTN com base nos dados imuno-histoquímicos sobre os receptores hormonais (ER e PR) e HER2, observamos que o FZD9 está significativamente mais expresso no grupo de pacientes com tumores TN (Figura 9A). Esse dado corrobora nosso achado anterior, reforçando a associação encontrada no GSE76275.

Devido à disponibilidade de informações no projeto TCGA, analisamos também o padrão de expressão de FZD9 com relação à classificação PAM50. Nessa classificação são considerados diferentes genes ao nível transcricional, o que difere da classificação clássica a partir dos receptores de estrógeno e progesterona e HER2 (imuno-histoquímica). Os tumores basais da classificação PAM50 e tumores TN da classificação molecular possuem uma correspondência em aproximadamente 80%, ou seja, 80% de tumores classificados como TN também são classificados como tumores basais (HOADLEY et al., 2018; ZAGAMI; CAREY, 2022b). Por este fato, e devido à alta disponibilidade de informação quanto a classificação PAM50, optamos por utilizar esse dado e explorar a população do TCGA e do projeto SCAN-B. Na classificação PAM50 é observado maior expressão de FZD9 nos tumores basais comparados aos demais subtipos (Figura 9B).



**Figura 9.** Expressão de FZD9 na população do TCGA. A) Expressão de FZD9 em pacientes com tumores de mama triplo negativo e não triplo-negativo, classificados segundo a ausência total ou presença de RE, RP e HER2. B) Níveis de FZD9 em subtipos tumorais segundo a classificação PAM50. Dados clínico-patológicos provenientes do estudo TCGA. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

O projeto TCGA contém ainda informações sobre o metiloma da população estudada. Esses dados foram baixados e analisados. Pacientes com câncer de mama triplo negativo apresentam um padrão de metilação inferior aos nTN (Figura 10A). Os tumores basais seguem o mesmo perfil, apresentando menor padrão de metilação (Figura 10B).



**Figura 10.** Padrão de metilação de FZD9. A) perfil de metilação de FZD9 em pacientes com câncer de mama não triplo negativo e triplo negativo. B) perfil de metilação de FZD9 em pacientes com câncer de mama segundo a classificação PAM50. Dados clínico-patológicos provenientes do estudo TCGA. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.



#### 4.2.2 The Sweden Cancerome Analysis Network - Breast (SCAN-B)

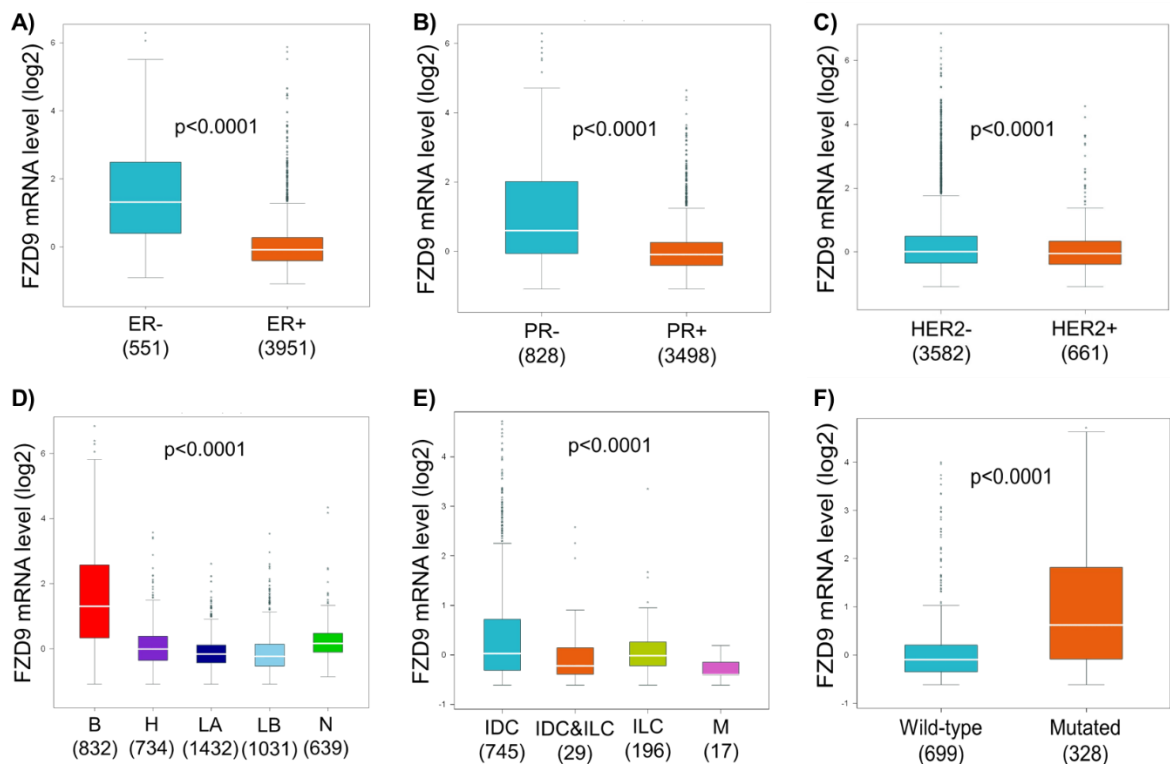
Em análise realizada no bcGenExMiner, identificamos diferenças significativas, utilizando um conjunto de dados ainda maior, o que confirmou nossas conclusões apresentadas na Tabela 3. Além disso, identificamos altos níveis transcricionais de FZD9 em pacientes com mutações p53 ( $p < 0,0001$ ), grau 3 da classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) ( $p < 0,0001$ ) e também no índice prognóstico de Nottingham ( $p < 0,0001$ ). Pacientes com status basal-like, status TN e a combinação de TN e basal-like exibiram um alto nível de expressão de FZD9 ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Relação entre a expressão de FZD9 e parâmetros clínicos de pacientes com câncer de mama usando o banco de dados bc-GenExMiner.

Variáveis	Nº de pacientes	RNA seq	p-valor*	Nº de pacientes	Microarray	p-valor*
<b>Idade</b>						
≤40	239	-		797	-	
>40 ≤70	2.851	Reduzido	<0,0001	5.292	Reduzido	<0,0001
>70	1.217	Reduzido		1.417	Reduzido	
<b>ER</b>						
Negativo	551	Aumentado	<0,0001	2.249	Aumentado	<0,0001
Positivo	3.911	-		6.310	-	
<b>PR</b>						
Negativo	828	Aumentado	<0,0001	1.427	Aumentado	<0,0001
Positivo	3.498	-		1.994	-	
<b>HER2</b>						
Negativo	3.582	Aumentado	<0,0001	2.387	-	0,0955
Positivo	661	-		436	-	
<b>P53 status</b>						
Selvagem	699	-	<0,0001	1.328	-	<0,0001
Mutatado	328	Aumentado		652	Aumentado	
<b>Status linfonodal</b>						
Negativo	2.415	Aumentado	0,0105	4.431	-	0,2060
Positivo	1.646	-		3.458	-	
<b>SBR</b>						
1	544	-		889	-	
2	1.699	Reduzido	<0,0001	2.926	Reduzido	<0,0001
3	1.374	Aumentado		2.933	Aumentado	
<b>NPI</b>						
1	1.173	-		1.234	-	
2	1.525	Aumentado	<0,0001	2.119	Aumentado	<0,0001
3	416	Aumentado		675	Aumentado	
<b>Status basal-like</b>						
Não basal-like	3.836	-	<0,0001	7.231	-	<0,0001
Basal-like	832	Aumentado		1.870	Aumentado	
<b>Status triplo-negativo</b>						
Não triplo-negativo	4.119	-	<0,0001	6.590	-	<0,0001
Triplo-negativo	317	Aumentado		572	Aumentado	
<b>Status triplo-negativo e basal-like</b>						
Não basal-like and não TNBC	3.689	-	<0,0001	5.811	-	<0,0001
Basal-like e TNBC	267	Aumentado		406	Aumentado	

SBR | NPI: p-valor refere-se ao grupo e o nível de maior expressão é relatado em relação ao nível 1. SBR: Scarff-Bloom-Richardson; NPI: Nottingham Prognostic Index. \*A significância estatística foi determinada pelo teste de Welch.

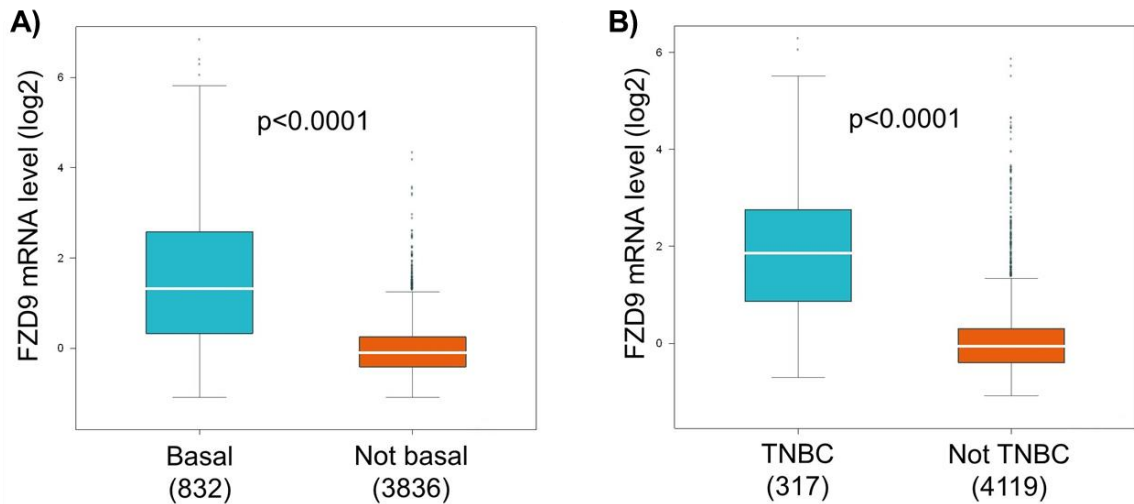
Uma análise do padrão de expressão de FZD9 em tumores de mama foi realizada no portal bc-GenExMiner, e diferenças médias significativas foram observadas em relação aos receptores hormonais ( $p < 0,0001$ ) e HER2 ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 11A-C).



**Figura 11.** Expressão de FZD9 projeto SCAN-B e TCGA. Perfil de mRNA de FZD9 em função de: A) receptor de estrogênio; B) receptor de progesterona; C) receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo II; D) classificação PAM50; E) Subtipo histológico; e F) status mutacional de TP53. Foram utilizados apenas dados de RNAseq de pacientes provenientes do estudo SCAN-B e TCGA. B: Basal; H: HER2+; LA: Luminal A; LB: Luminal B; N: Normal-like; IDC: Carcinoma ductal invasivo; ILC: Carcinoma lobular invasivo; M: Carcinoma mucinoso; ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo II.

Diferenças médias importantes foram registradas no bc-GenExMiner. O padrão médio de expressão de FZD9 foi significativamente maior em tumores basais do que em outros subtipos de acordo com a classificação PAM50 (Figura 11D). Em relação às características histopatológicas, o carcinoma ductal invasivo apresentou alta expressão média de FZD9 (Figura 11E). Finalmente, mulheres com mutação p53 (Figura 11F) também apresentaram maior expressão de FZD9.

De modo semelhante aos resultados obtidos exclusivamente na análise de pacientes do projeto TCGA (Figura 9), a expressão de FZD9 em pacientes do estudo SCAN-B aponta um mesmo padrão. Neste sentido, pacientes com tumores de mama basal (Figura 12A) ou TN (Figura 12B) apresentam maior nível transcricional de FZD9.



**Figura 12.** Expressão de FZD9 projeto SCAN-B e TCGA. A) Padrão de expressão de FZD9 em pacientes com câncer de mama basal e não basal. B) Padrão de expressão de FZD9 em pacientes com câncer de mama triplo-negativo e não triplo-negativo. Foram utilizados apenas dados de RNAseq de pacientes provenientes do estudo SCAN-B e TCGA. TNBC: câncer de mama triplo-negativo.

#### 4.2.3 Análise prognóstica de FZD9

Com base nas informações obtidas do Prognoscan, identificamos 5 estudos mostrando associação entre FZD9 e pior prognóstico (Figura 13). O *Hazard Ratio* de cada estudo foi utilizado e com exceção do E-TABM-158, todos apontam que o aumento do transcrito de FZD9 confere maior chance de óbito, recidiva e metástase a distância comparado com indivíduos que expressão valores inferior a mediana.

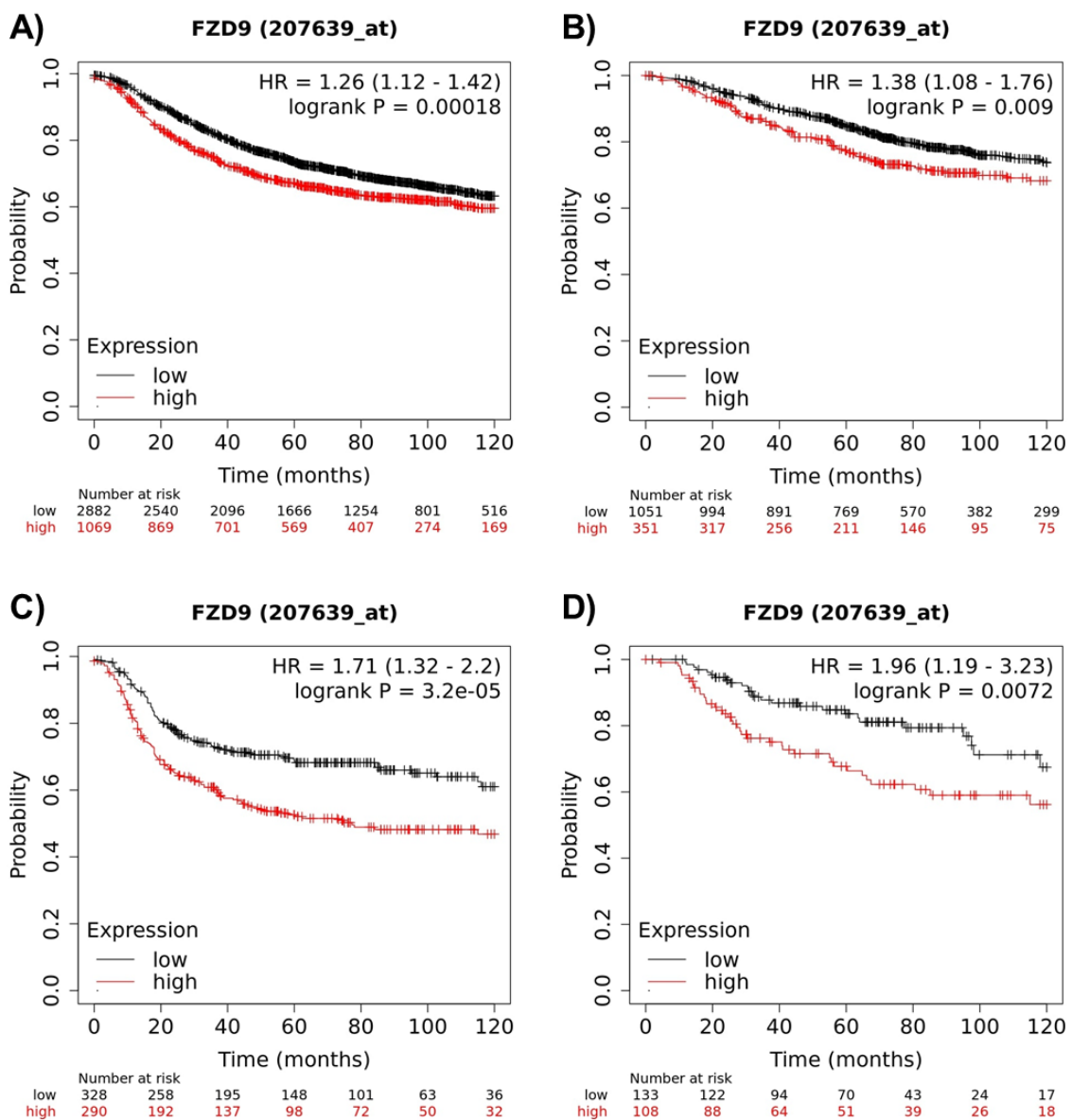
End point	Study	HR
Relapse Free Survival	GSE12276	1.13 [1.00, 1.28]
Distant Metastasis Free Survival	GSE11121	1.63 [1.15, 2.30]
Overall Survival	GSE1456-GPL96_OS	2.00 [1.29, 3.11]
Relapse Free Survival	GSE1456-GPL96_RFS	1.75 [1.10, 2.79]
Disease Specific Survival	E-TABM-158	0.28 [0.09, 0.93]

0.09      1.60      3.11  
HR and 95% CI

**Figura 13.** Papel prognóstico de FZD9 em diferentes estudos e distintos perfis prognósticos.

HR: Hazard Ratio. Análise conduzida por meio da ferramenta online Prognoscan.

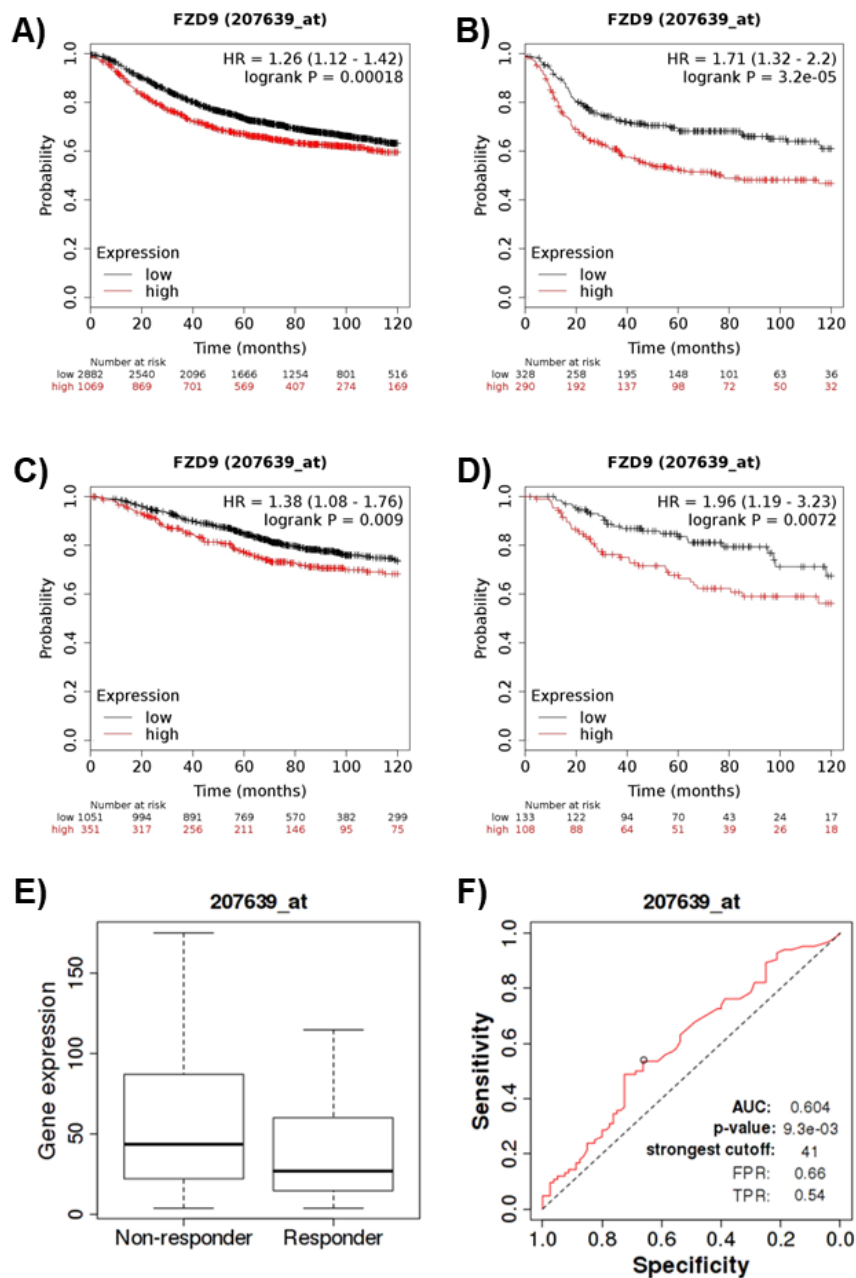
Usando a ferramenta online KM Plotter, identificamos uma associação significativa entre altos níveis de FZD9 e pior sobrevida livre de recidiva (RFS) (Figura 14A;  $p=0,0001$ ) e sobrevida global (OS) (Figura 14B;  $p=0,009$ ) em pacientes com qualquer subtipo de câncer de mama. Ao considerar o subtipo basal, essas diferenças foram mais evidentes, mostrando um maior distanciamento entre as curvas, tanto para RFS (Figura 14C) quanto para OS (Figura 14D).



**Figura 14.** Análise de sobrevida em função da expressão mediana de FZD9. A) Sobrevida livre de recidiva (RFS) e B) sobrevida global (OS) considerando todos subtipos de câncer de mama; C) RFS e OS de pacientes com câncer do subtipo basal. Análises conduzidas no KM Plotter com utilização da sonda 207639\_at.

#### 4.2.4 Associação de FZD9 e resposta terapêutica

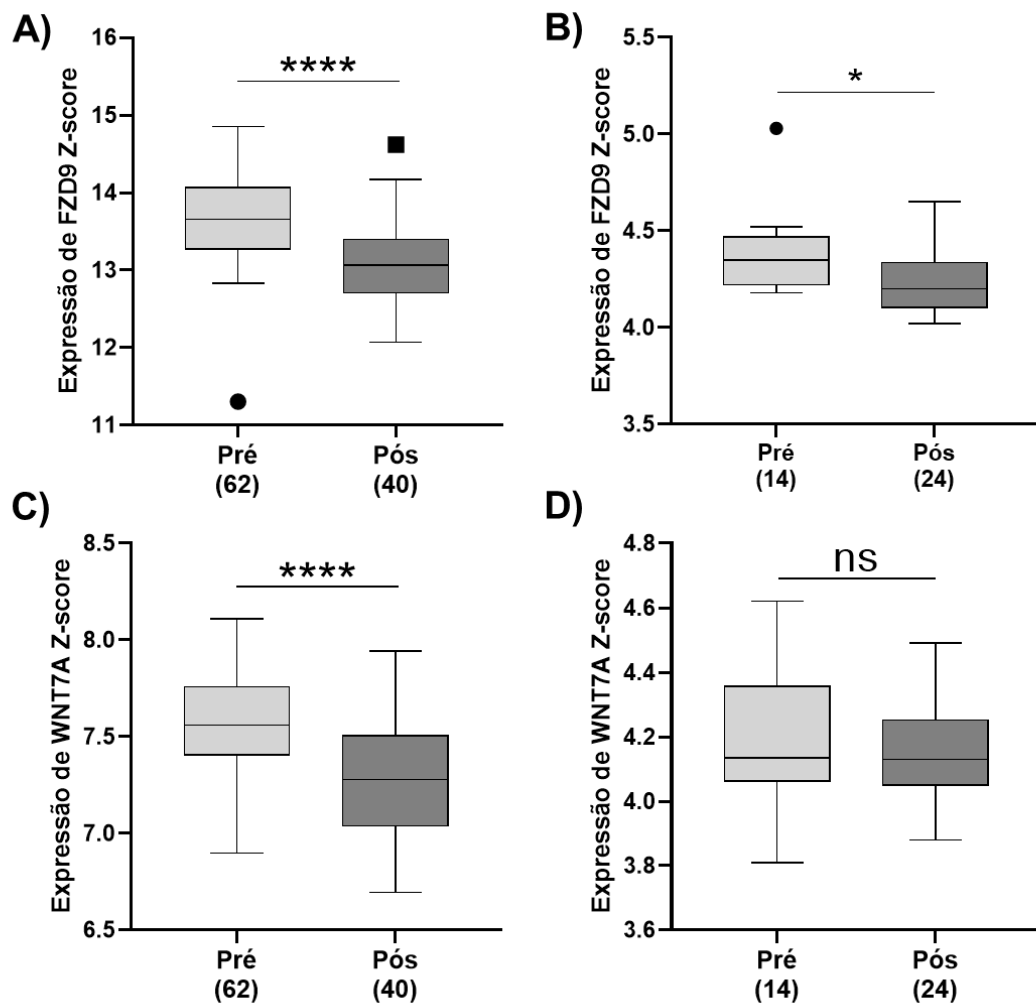
Considerando os relatos de vários estudos anteriores indicando o FZD9 como um biomarcador potencial para a resposta ao tratamento com radioterapia e quimioterapia, realizamos uma análise de sobrevida usando o KM Plotter considerando apenas os pacientes que foram tratados com quimioterapia (CHO et al., 2019). Identificamos que tanto para a RFS (Figuras 15A, B) quanto para a OS (Figuras 15C, D) exibiram um prognóstico significativamente pior no grupo de pacientes com altos níveis de FZD9, o que é ainda mais marcante para tumores basais. Houve uma diferença significativa nos níveis medianos de expressão de FZD9 entre pacientes TNBC sem resposta ao tratamento quimioterápico quando comparados aos que responderam (Figura 15E). De acordo com esse resultado, a análise para classificar os pacientes entre grupos respondentes e não respondentes com base no RFS em 5 anos mostrou uma associação significativa sutil, conforme evidenciado pelos resultados da área sob a curva (AUC), taxa de verdadeiros positivos, e menor taxa de falsos positivos (FPR) (Figura 15F).



**Figura 15.** O padrão de expressão de FZD9 apenas em pacientes tratados com quimioterapia. Sobrevida livre de recidiva mostrando A) todos os subtipos de tumor e B) subtipos basais. Análise de sobrevida global C) considerando todos os subtipos de tumores de mama e D) tumores basais; E) Sobrevida livre de recaída em 5 anos entre respondedores e não respondedores à quimioterapia em pacientes TNBC; F) Curva Roc para níveis altos e baixos de FZD9 em respondedores e não respondedores à quimioterapia. Área sob a curva (AUC), taxa de verdadeiros positivos (TPR) e menor taxa de falsos positivos (FPR); Todas as curvas de sobrevivência foram obtidas no KM Plotter. A curva Roc e os pacientes respondedores foram obtidos na plataforma ROC Plotter. TNBC: câncer de mama triplo negativo; ROC: característica operacional do receptor.

Visando identificar o efeito de terapias usuais sobre FZD9, dois estudos do *GEO database* foram acessados. O estudo GSE147271(KASTRATI et al., 2020) é composto por 102 amostras de câncer de mama primário, antes e após tratamento

neoadjuvante com tamoxifeno. O estudo GSE18864 (JUUL et al., 2010) realizou monoterapia neoadjuvante com cisplatina para tratar 28 pacientes com TNBC, dos quais 24 continham informações clínico-patológicas e a expressão de FZD9. Em ambos os estudos foram utilizadas técnicas de *microarray* para avaliar o perfil transcricional antes e pós aplicação do fármaco. Observamos que o tratamento com tamoxifeno ou cisplatina foram capazes de reduzir significativamente os níveis de FZD9 (Figura 16A, B).



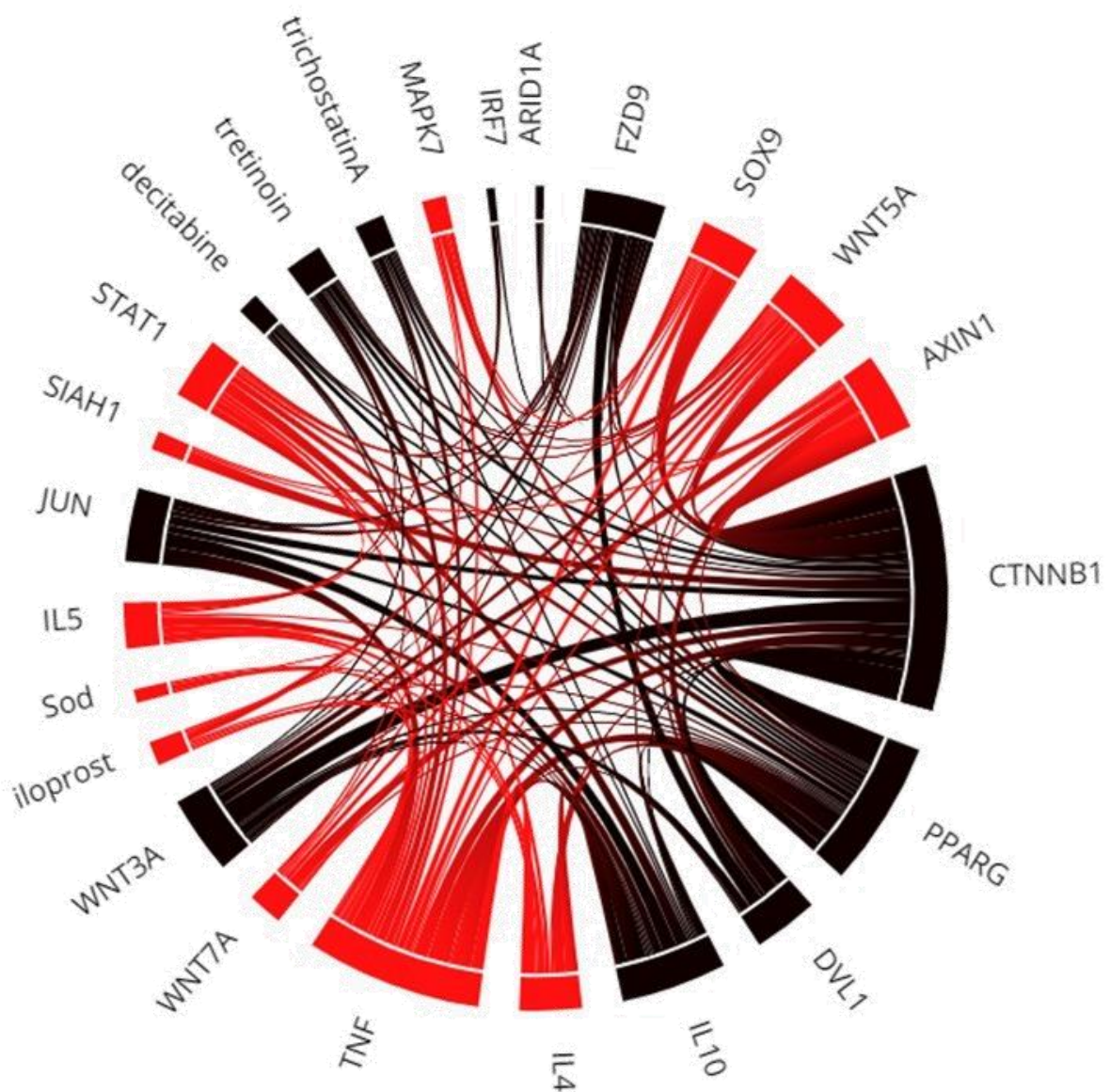
**Figura 16.** Expressão de FZD9 antes e após tratamento neoadjuvante. A) Pacientes do estudo GSE147271 tratadas com tamoxifeno. B) Pacientes do estudo GSE18864 tratadas com cisplatina. Dados acessados no portal GEO database.

#### 4.2.5 Rede de interação gênica e medicamentosa

A fim de explorar a relação de FZD9 com outros genes e possíveis fármacos capazes de regular sua atividade, conduzimos uma análise no software *Ingenuity*



*Pathway Analysis* (IPA). Para isso foi utilizado a sigla FZD9 seguido de construção da rede por meio do item “Grow”. Este item é capaz de aumentar o número de relações diretas e indiretas mais próximas ao termo central, nesse caso o FZD9. A partir disso, identificamos genes *up* e *downstream* na via biológica Wnt canônica e não canônica (Figura 17). A tricostatina A (TRAN et al., 2013), decitabina (ACHILLE et al., 2016) e o iloprost (SOMPEL et al., 2022) foram testadas em estudos de outros grupos de pesquisa. Em ambos, o FZD9 é referido como sendo modulado após o tratamento com os respectivos fármacos. Os demais genes relacionados com o FZD9 estão associados com vias de processos inflamatórios, como o TNF.

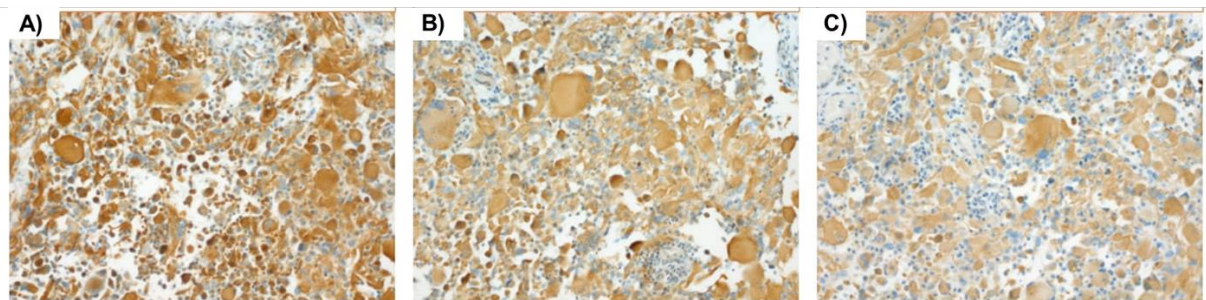


**Figura 17.** Diagrama de cordas. A análise de interações gênicas e farmacológicas foi conduzida no Ingenuity Pathway Analysis. Os dados foram exportados e o diagrama construído por meio do Datasmith.org. As cores preto e vermelho compõem apenas o layout do diagrama, contudo a espessura das cordas indica maior ou menor número de interações.

### 4.3 Validação de FZD9 em população de mulheres brasileiras por IHC

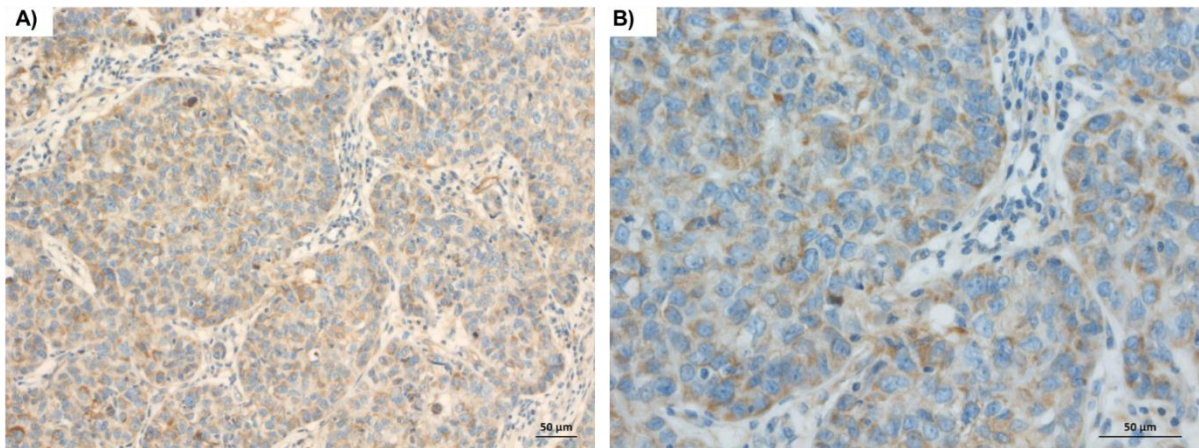
A identificação e validação *in silico* dos níveis transcricionais de FZD9 o elencam como um promissor marcador prognóstico e possível alvo terapêutico em pacientes com câncer de mama. Em função disso, utilizamos amostras histológicas de mama para validar através de imuno-histoquímica (IHC) os achados anteriormente citados.

A técnica imuno-histoquímica foi conduzida integralmente no equipamento Ventana conforme descrição metodológica. A padronização do anti-FZD9 foi realizada inicialmente a partir de cortes histológicos de glioblastomas devido à evidência científica previamente observada por Zhang e colaboradores (2006) (ZHANG et al., 2006). Em função das concentrações recomendadas pelo fabricante, o anti-FZD9 foi testado em 1:250, 1:500 e 1:1000 (Figura 18A, B, C).



**Figura 18.** Padronização imuno-histoquímica para o anti-FZD9 em lâminas de biópsias provenientes de pacientes com glioblastoma. As imagens representam a marcação positiva para FZD9 nas concentrações de A) 1:250; B) 1:500 e C) 1:1000. Os testes foram realizados com amostras de diferentes pacientes seguindo as mesmas concentrações. As imagens escolhidas representam os demais ensaios e estão em objetiva de 20X.

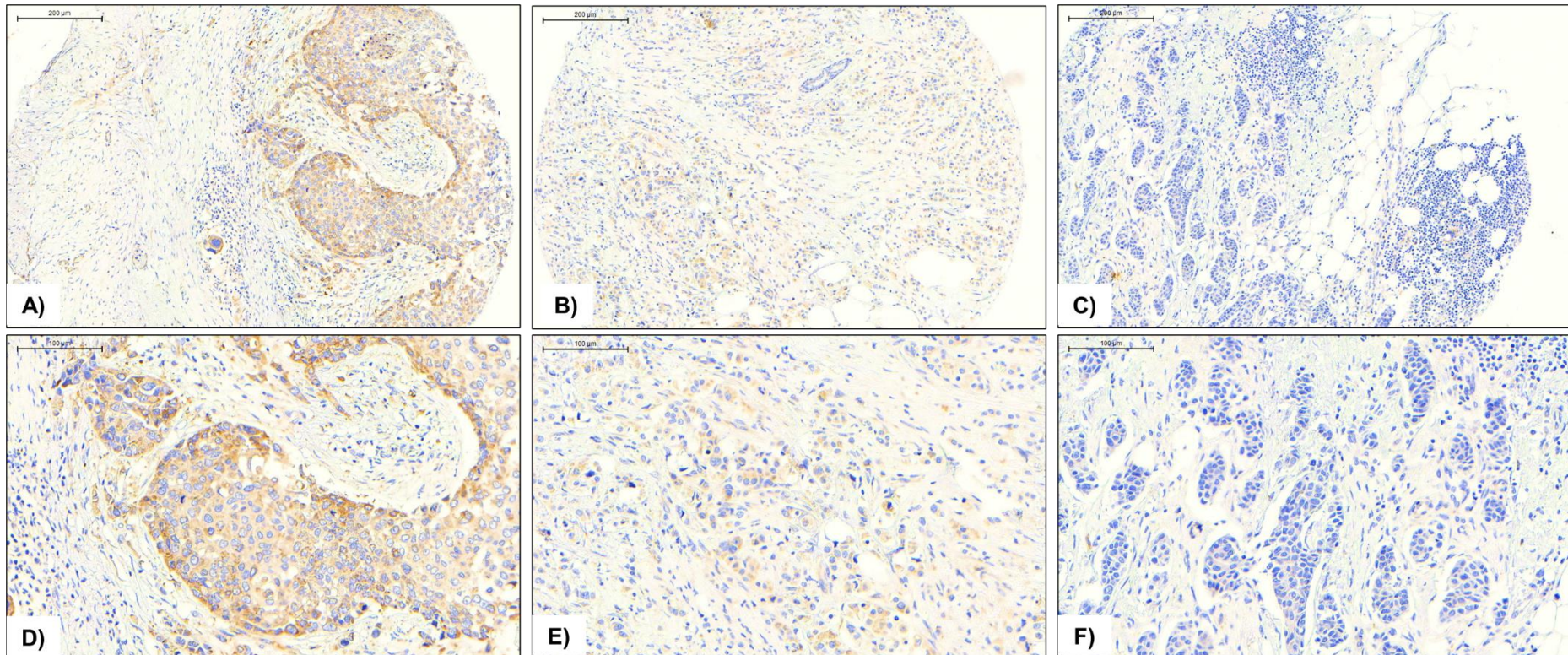
As mesmas concentrações foram testadas em tecidos de câncer de mama triplo negativo, sendo a concentração de 1:500 escolhida para dar seguimento nas análises por IHQ (**Figura 19**).



**Figura 19.** Padronização imuno-histoquímica para o anti-FZD9 em lâminas de tecidos provenientes de pacientes com câncer de mama triplo-negativo. Concentração de 1:500 em aumento de A) 20X e B) 40X.

A análise IHQ do *tissue microarray* (TMA) foi realizada conforme estabelecido na padronização. O TMA é composto por tecidos de 92 pacientes, dos quais 7 foram excluídos devido à ausência de dados clínico-patológicos que inviabilizam categorizar o subtipo tumoral, além de outras informações pertinentes. Outros 4 casos foram excluídos por perda de amostra por desprendimento durante a reação de IHQ. As 81 amostras restantes foram analisadas em triplicata. As informações referentes aos receptores hormonais ER e PR, além de HER2 e marcador de proliferação Ki67, bem como estágio tumoral e classificação molecular foram coletadas pelo estudo original conduzido pela Profa., Maria Aparecida Nagai em conjunto com o patologista Dr. Evandro Sobroza de Melo e o serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, os quais agradecemos imensamente.

Após submeter as lâminas de TMA para detecção do FZD9, as mesmas foram avaliadas por patologista experiente. Uma imagem representativa da marcação forte (Figura 20A, D), fraca (Figura 20B, E) e negativa (Figura 20C, F) podem ser observadas. Foram consideradas positivas as marcações fracas, moderadas e fortes que dizem respeito a score maior que 1,0.



**Figura 20.** Análise imuno-histoquímica em *tissue microarray* de pacientes com câncer de mama. A) marcação forte para presença de FZD9. B) marcação fraca para presença de FZD9. C) marcação negativa para FZD9. Amostra representativa do TMA analisado. As imagens correspondem às objetivas de 10X (A, B e C) e 20X (D, E e F).

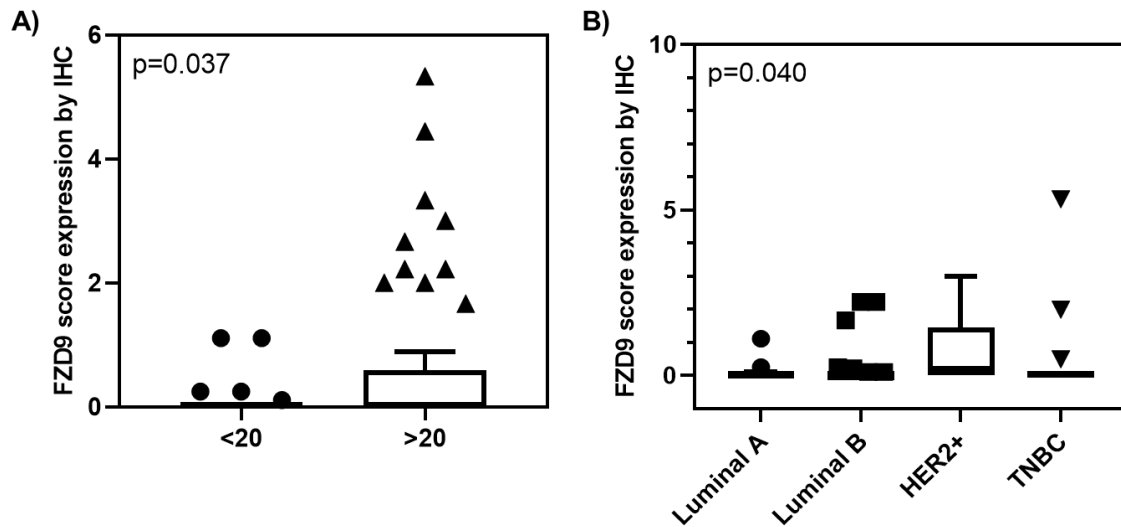
Para as análises subsequentes foram consideradas positivas as amostras que apresentaram score maior que 1,0. A tabela de contingência apontou associações significativas em função de HER2 (Tabela 6;  $p=0,009$ ) e classificação molecular ( $p=0,043$ ). Não foram observadas associações quanto aos receptores hormonais e demais características clínico-patológicas.

**Tabela 6.** Características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama após análise imuno-histoquímica de FZD9.

Parâmetros	Negativo		Positivo		p-value
	n	%	n	%	
<b>Idade</b>					
≤50	12	21,1	6	25	0,696
>50	45	78,9	18	75	
<b>RE</b>					
Negativo	13	23,6	7	31,8	0,460
Positivo	42	76,4	15	68,2	
<b>RP</b>					
Negativo	17	30,9	9	37,5	0,566
Positivo	38	69,1	15	62,5	
<b>HER2</b>					
Negativo	48	88,9	16	64	0,009
Positivo	6	11,1	9	36	
<b>TNM</b>					
I	13	22,8	2	8,3	0,442
II	25	43,9	12	50	
III	15	26,3	7	29,2	
IV	4	7	3	12,5	
<b>Subtipo</b>					
Luminal A	10	19,2	3	13,6	0,043
Luminal B	28	53,8	9	40,9	
HER2	3	5,8	7	31,8	
TNBC	11	21,2	3	13,6	

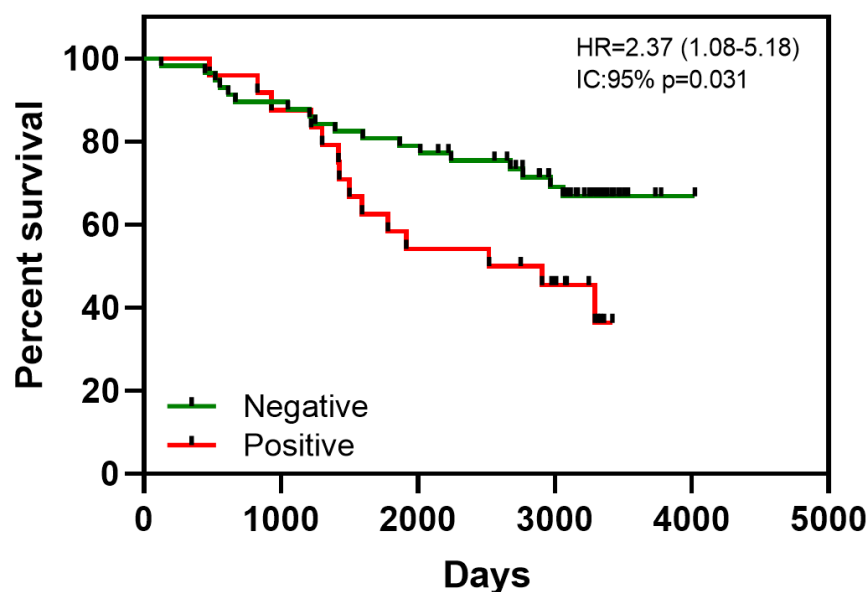
RE: receptor de estrógeno. RP: receptor de progesterona. HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo II. TNM: Classificação de tumores malignos. TNBC: câncer de mama triplo-negativo.

Observamos um score mais elevado de FZD9 em pacientes com mais de 20% de marcação para Ki67 (marcador de proliferação celular; Figura 21A;  $p=0,037$ ). Quanto ao subtipo molecular a análise estatística apontou para uma diferença significativa (Figura 21B;  $p=0,04$ ), sendo mais evidente baixos níveis no subtipo Luminal A.



**Figura 21.** Análise imuno-histoquímica com score de expressão de FZD9. Score em função de A) níveis percentuais da marcação de Ki67 e B) classificação TNM. TNM: Classificação de tumores malignos. IHC: imuno-histoquímica. TNBC: câncer de mama triplo-negativo. Amostras do TMA analisadas com anti-FZD9 em 1:500. Os casos negativos não foram considerados para a análise.

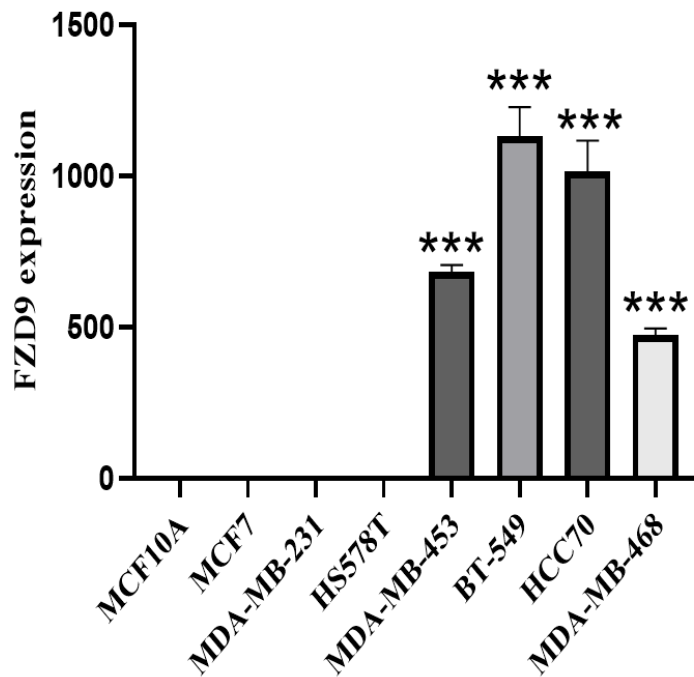
Para a análise de sobrevida global, os casos foram divididos em negativos e positivos. Os casos negativos foram considerados aqueles sem nenhuma marcação de FZD9, enquanto os casos positivos correspondem a marcações fraca, moderada e forte. Foi observada associação significativa entre presença de FZD9 e pior sobrevida das pacientes com câncer de mama (Figura 22; HR=2,37; p=0,03).



**Figura 22.** Sobrevida global. Amostras do TMA analisadas com anti-FZD9 em 1:500. Os casos positivos correspondem a marcação fraca e marcação forte na análise por imuno-histoquímica.

#### 4.4 FZD9 em linhagens celulares

Expressão de FZD9 em linhagem celular representativa de tecido normal da mama (MCF10A), derivada de câncer de mama luminal (MCF7) e derivadas de cânceres de mama triplo-negativos (MDA-MB-231, HS578T, MDA-MB-453, BT-549, HCC70 e MDA-MB-468) (Figura 23). Não foram detectados níveis transcricionais nas linhagens MCF10A, MCF7 ou na MDA-MB-231. A linhagem HS578T apresentou níveis próximos ao valor zero e foi utilizada como referência para calcular o  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . As linhagens MDA-MB-453, BT-549, HCC70 e MDA-MB-468 exibiram altos níveis do transcrito.

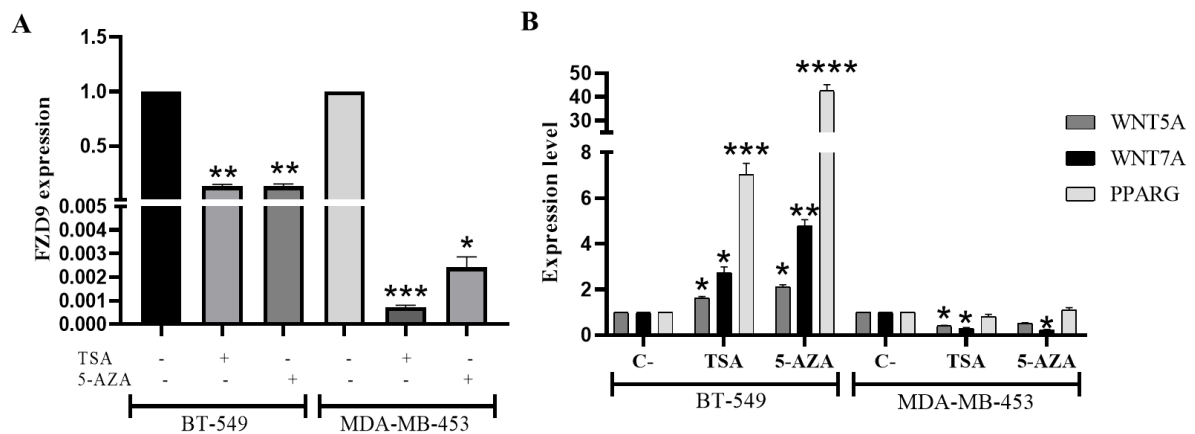


**Figura 23.** Expressão de FZD9 por qRT-PCR. Experimentos conduzidos em triplicata biológica, seguido de triplicata técnica. O  $2^{-\Delta\Delta CT}$  foi calculado tendo o GAPDH como controle endógeno e a linhagem HS578T como referência.

Nossas análises *in silico* e dados da literatura, indicam que o FZD9 possa atuar como um possível oncogene em câncer de mama. As análises no IPA apontam que medicamentos como a decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina), a tricostatina A e o iloprostá, possuem a capacidade de atuar direta ou indiretamente sobre FZD9, com capacidade de reduzir sua expressão. Nesse sentido, conduzimos experimentos com

a 5-aza e a tricostatina A. A definição da dosagem foi realizada a partir de diferentes concentrações, variando de 0,1 nanomolar a 2 micromolar, por um período de sete dias. A definição da dose baseou-se na manutenção morfológica inicial e de crescimento celular, em comparação com a célula parental. Observamos que as linhagens representativas de subtipos de TNBC: BT549 e MDA-MB-453, tiveram redução de níveis de mRNA de FZD9 após serem tratadas com os respectivos fármacos (Figura 24A).

Em função de dados na literatura mostrando que WNT7A atua diretamente sobre FZD9, induzindo-o a uma via não-canônica com regulação de PPARG e consequente efeito antitumoral, investigamos possíveis alterações em níveis de mRNA desses genes. Na linhagem BT-549 foi observado aumento de WNT7A e PPARG, no entanto houve uma redução transcricional na linhagem MDA-MB-453 (Figura 24B).



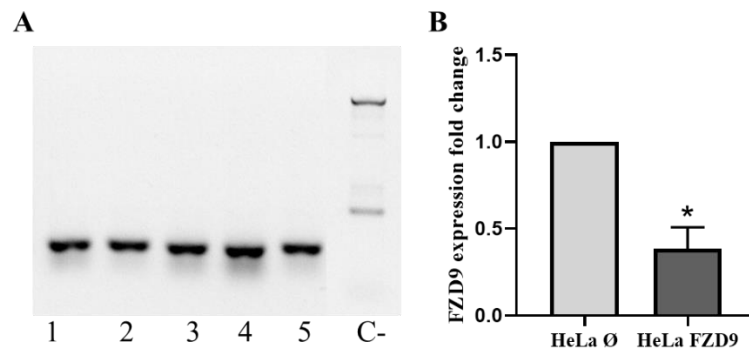
**Figura 24.** Análise de expressão após tratamento com tricostatina A ou 5-AZA. A) Padrão de expressão de FZD9 antes e após tratamento. B) Padrão de expressão de WNT5A, WNT7A e PPARG antes e após tratamento. A concentração para BT-549 e MDA-MB-453, foi de 25nM e 10nM para TSA, respectivamente e de 2,0 $\mu$ M para 5-AZA em ambas as linhagens. Os ensaios foram conduzidos em triplicata biológica em placa de 6 poços.

#### 4.5 Validação da técnica de CRISPR

Em função dos dados obtidos em nosso estudo, bem como os apresentados por Hachim e colaboradores (HACHIM et al., 2020), inferimos um papel oncogênico relacionado ao FZD9. Para compreender esse fenômeno, utilizamos a técnica de CRISPR/Cas9 para explorar possíveis associações de FZD9 com o comportamento celular *in vitro*. Nesse sentido, bactérias STBL3 foram eletroporadas com o intuito de



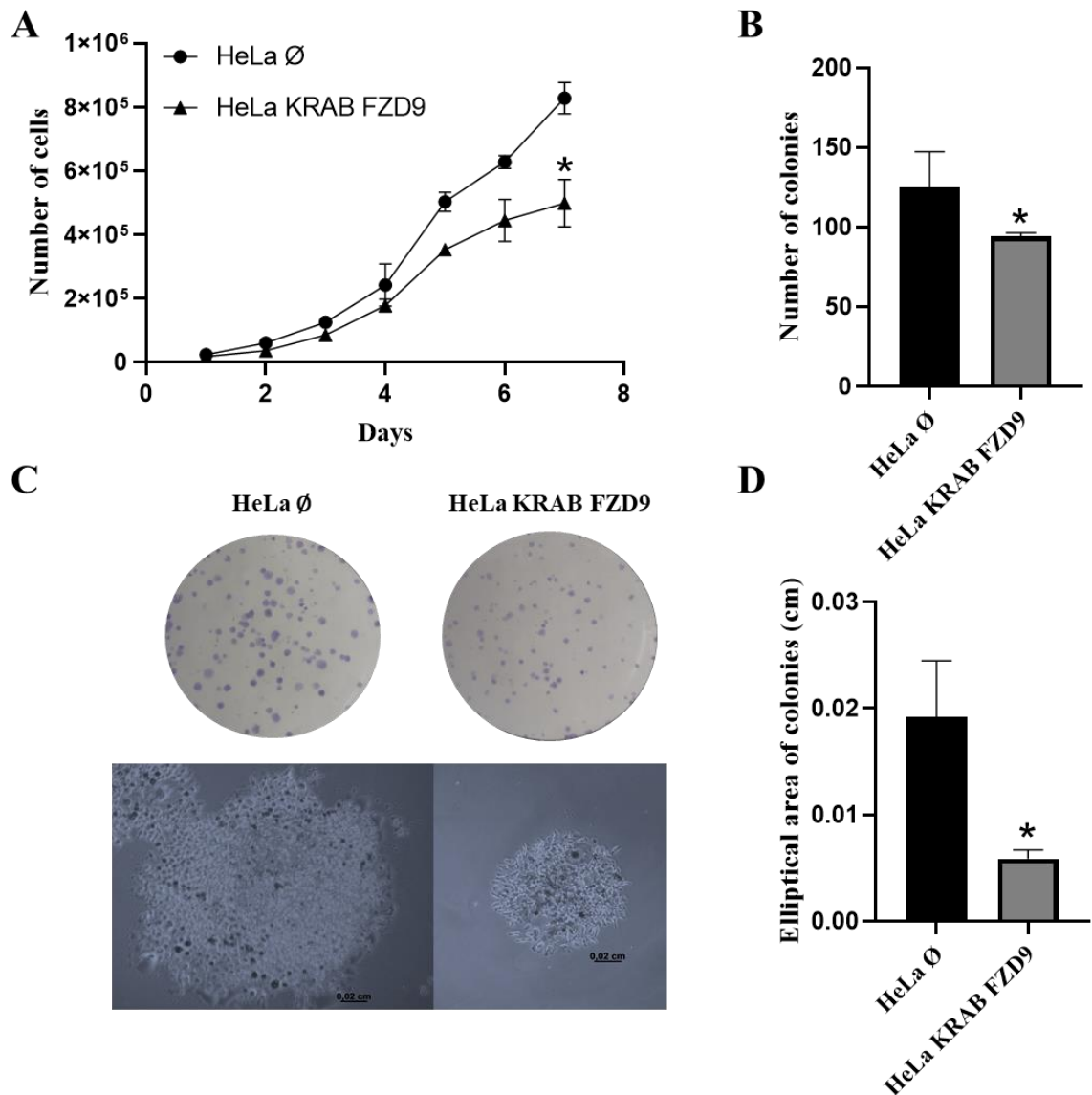
incorporarem o plasmídeo contendo o *guide*, seguido de recuperação por 1h em meio SOC e plaqueadas em LB ágar com 10µg/mL de ampicilina. As colônias formadas foram selecionadas para análise de PCR a fim de identificar a incorporação do plasmídeo. As 5 colônias analisadas apresentaram um *amplicon* compatível com 102 pares de base, formados entre o promotor U6 e o respectivo *guide* (Figura 25A). Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo sem inserção de *guide* (vetor vazio, Ø), o qual forma bandas de tamanhos diferentes devido à ligação do primer apenas sítio no promotor U6.



**Figura 25.** Confirmação da técnica de CRISPR. A) PCR de colônias de STBL3 resistentes à ampicilina. B) RT-qPCR de HeLa após transdução e 10 passagens. 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se a colônias utilizadas para análise e como controle negativo foi utilizado o vetor sem *guide* inserido. Teste de Mann-Whitney. C-: Controle negativo, vetor vazio.

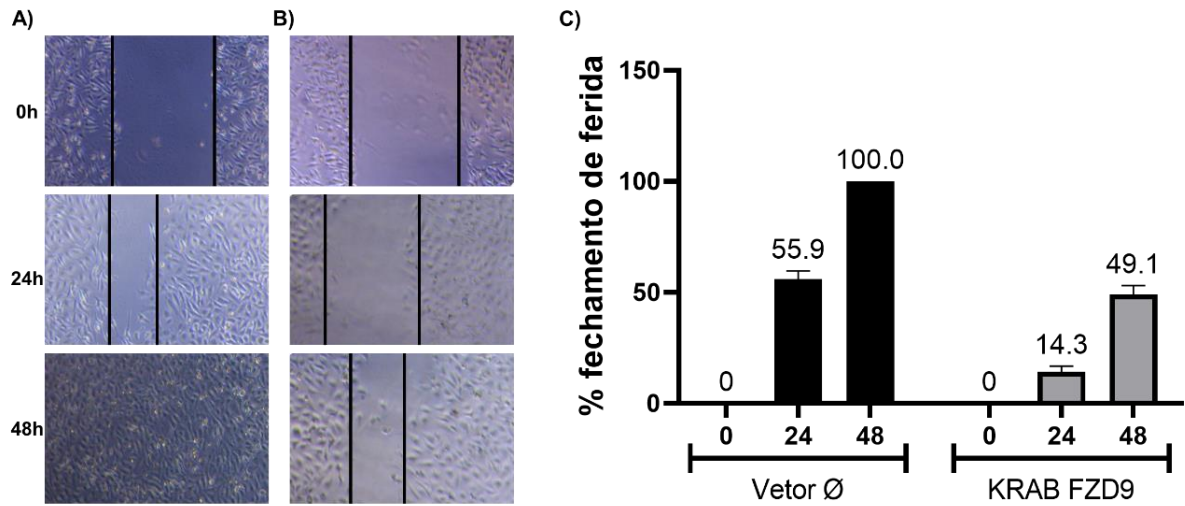
Células HeLa com repressão de FZD9 (HeLa KRAB FZD9) foram utilizadas para testes funcionais com o objetivo de compreender o papel deste gene na capacidade proliferativa e de formação de colônias. Foi observada redução da capacidade destas células em duplicar comparadas com o vetor vazio (Figura 26A).

A eficiência da formação de colônias foi 26,5% menor nas células HeLa KRAB FZD9 ( $p=0,01$ ; Figura 26B). A redução de FZD9 resultou em colônias com menor área elíptica (Figura 26C, D).



**Figura 26.** Ensaios funcionais em HeLa após repressão de FZD9. A) ensaio de proliferação, utilizando a HeLa vetor vazio e HeLa com repressão de FZD9. Ensaio clonogênico em placa de 6 poços, evidenciando em: B) a contagem de colônias; C) imagem representativa das colônias a olho nu (parte superior da imagem) e imagem representativa do tamanho das colônias ao microscópio (aumento de 4x); D) média da área elíptica das colônias.

As células HeLa sem edição de FZD9 (vetor  $\emptyset$ ) e com FZD9 reprimido (KRAB FZD9) foram submetidas ao ensaio de migração em placa de 12 well. Foram semeadas 10 mil células e após atingir confluência entre 90 e 100%, foi realizado o tratamento com droga antimetabólica (mitomicina) a 10 $\mu$ M seguido da ferida provocada com auxílio de uma ponteira. As imagens registradas em 24h mostram um fechamento de 55,9% em comparação ao tempo zero e foi totalmente fechado após 48h (Figura 27A, C). Já a repressão de FZD9 por iCRISPR/Cas9 levou a um fechamento de 14,3% da área em 24h e aproximadamente 50% em 48h (Figura 27B, C).



**Figura 27.** Ensaio de migração. A) HeLa vetor vazio. B) HeLa KRAB FZD9. C) Percentual de fechamento de ferida analisado no ImageJ. Técnica de wound healing com uso de mitomicina como agente antimitótico. Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata técnica e triplicata biológica. Placas de 12 well foram utilizadas. Fotografias realizadas em microscópio com câmera acoplada em 0, 24 e 48 horas de experimento em objetiva de 10X.

## 5. DISCUSSÃO

Mesmo com todo o progresso no tratamento de pacientes acometidas pelo câncer de mama, observa-se que nem todas respondem de modo satisfatório e sofrem constantemente com recidivas capazes de alterar drasticamente seu prognóstico (LUQUE-CABAL et al., 2016; MOREIRA; CUNHA; ESTEVES, 2020). Nesse sentido, a busca por novos biomarcadores com capacidade de auxiliar na distinção de diferentes características clínico-patológicas, na predição de resposta aos tratamentos ou análise prognóstica, continuam como alvo intenso de pesquisadores em todo o mundo. Em função disso, o presente trabalho iniciou-se com a busca de biomarcadores prognósticos capazes de diferenciar tumores de mama triplo-negativo de não triplo-negativo. Para esse fim, uma população composta por 265 casos de pacientes com câncer de mama foi utilizada neste trabalho (grupo de identificação) para identificar genes diferencialmente expressos entre tumores de mama triplo-negativos e não triplo-negativos. Os dados de *microarray* do GSE76275 disponibilizados na literatura através da plataforma *Geo database* (BURSTEIN et al., 2015), foram analisados por meio da ferramenta GEO2R seguido da correção estatística de Benjamini e Hochberg. As principais sondas de acordo com valor p ajustado foram utilizadas para uma análise rápida no KM Plotter. Para critério de seleção utilizamos a sonda com menor valor p ajustado e associação significativa com sobrevida global e sobrevida livre de recidiva. Dentro desses critérios, a sonda 207639\_at referente ao FZD9 surge como foco para nossas pesquisas e posteriores validações.

Nossos resultados indicam que alterações nos níveis de FZD9 o possam caracterizar como um potencial biomarcador prognóstico e eventual alvo terapêutico. Em câncer de mama, nosso estudo observou que a alta expressão de FZD9 está associada com o subtipo TNBC/Basal-like. Em uma pesquisa recente, análises imuno-histoquímicas foram conduzidas e corroboram nossos achados. Trata-se de uma coorte composta por 80 pacientes, onde a alta expressão de FZD9 foi significativamente associada com tumores basal-like após comparação com não basal-like, tanto em nível transcricional quanto proteico (HACHIM et al., 2020).

Ainda quanto ao grupo de identificação do FZD9 e pela disponibilidade da classificação de subtipos de TNBC por Burstein e colaboradores (BURSTEIN et al., 2015), observamos que os subtipos BLIA e BLIS apresentam maiores níveis

transcricionais de FZD9. Na literatura, não há análise para esse transcrito, especialmente considerando a classificação de Burstein, o que inviabiliza uma comparação. Todavia, é interessante ter em conta que os subtipos basal-like imunossuprimidos e imuno-ativados possuem pior prognóstico comparados aos subtipos luminais com receptor de andrógeno e mesenquimais. Outro aspecto importante foi verificado na tabela 4 com uma diferença significativa em relação ao grau tumoral. Tumores pouco diferenciados apresentaram maiores valores medianos de FZD9, independentemente do status hormonal. Esse dado é particularmente interessante, pois além de FZD9 ter uma diferença significativa quanto ao status TN/nTN, sua alta expressão parece também estar relacionada com tumores receptores hormonais positivos com maior grau tumoral.

A disponibilidade de dados de RNA-seq e clínico-patológicos do projeto TCGA e SCAN-B revolucionaram a pesquisa em todo o mundo. Esses dados permitem que pesquisadores de qualquer localidade possam elencar novas perguntas e até mesmo sua utilização como fonte de validação de achados experimentais, dado o valor amostral e sensibilidade da técnica aos quais as amostras de tumores das pacientes foram submetidas. Inicialmente acessamos os dados de expressão para o FZD9 por meio da plataforma cBioPortal, seguindo com o cruzamento aos dados clínico-patológicos por meio do *barcode* de identificação de cada paciente. Utilizando o mesmo sistema de classificação, observamos que a diferença de expressão de FZD9 é reprodutível nessa população, sendo que os tumores TNBC exibem maiores níveis transcricionais. Dada a disponibilidade de informações do projeto TCGA, adicionamos a classificação PAM50 que divide os tumores em basais - que tem uma sobreposição ao entorno de 80% com os TNBC -, em HER2, luminal A e B e normal-like com base em um painel de 50 genes chave. Ao analisar um possível impacto associado a eventos epigenéticos, foi observado um menor *status* de metilação nos tumores basais e TNBC, fato que é condizente com o perfil transcricional nessa mesma população. Por outro lado, os tumores luminais apresentam maior nível de metilação, seguido do subtipo HER2. Resultados semelhantes foram identificados no estudo de Benevolenskaya e colaboradores (2016), onde a hipermetilação de FZD9 foi observada em pacientes com câncer de mama com expressão dos receptores hormonais (BENEVOLENSKAYA et al., 2016).

A partir do *bcGeneExMiner* acessamos o projeto SCAN-B, o qual é

contemplado por dados de RNA-seq e *microarray*. O perfil de expressão de FZD9 se manteve similar em quase todos os parâmetros analisados, com exceção do status HER2. Aqui a finalidade foi validar o perfil transcricional de FZD9 em uma população ainda maior. Os resultados foram similares ao observado na população de identificação e no estudo TCGA, sendo os tumores basais e TNBC que exibiram maiores níveis transcricionais de FZD9. Além disso, observamos também uma diferença quanto ao status de TP53 (*tumor protein p53*), onde a alta expressão de FZD9 foi evidente nas pacientes com mutação. A inibição da via de p53, concomitante a ativação da via Wnt tem sido abordada na literatura e relacionada a um pior prognóstico, especialmente porque a mutação de p53 parece favorecer um cenário ideal para que mecanismos oncogênicos ganhem força (XIAO et al., 2022).

Com o objetivo de avaliar o papel prognóstico em função do FZD9, conduzimos análises no Prognoscan e no KM Plotter. Observamos associações significativas entre a alta expressão de FZD9 e diferentes desfechos relacionados ao status de sobrevida das pacientes. Até o momento não há na literatura relação prognóstica de FZD9 e câncer de mama, incluindo o trabalho de Hachim, que apesar de analisar o FZD9, nas curvas de sobrevida são apresentados apenas agrupamentos, sem a análise isolada que pudesse comparar a baixa e alta expressão com o desfecho clínico das pacientes. Nesse sentido, nosso trabalho traz não apenas novidades quanto ao padrão de expressão de FZD9, mas também quanto à sua influência sobre a sobrevivência das pacientes. Interessantemente, essa alta expressão foi associada ainda com uma pior resposta ao tratamento quimioterápico, sugerindo que o FZD9 possa estar implicado com a resistência terapêutica. Utilizando dados de *microarray*, disponíveis no *Geo database*, avaliamos os níveis transcricionais de FZD9 frente ao tratamento com tamoxifeno (utilizado em pacientes ER positivas) (KASTRATI et al., 2020) ou com cisplatina que foi utilizado em estudo com pacientes com TNBC (JUUL et al., 2010). Em ambas as situações, o tratamento levou à diminuição de FZD9. Contudo, houve ainda diminuição dos níveis de WNT7A no caso das pacientes que receberam tamoxifeno e uma não foi observado diferença significativa naquelas que receberam cisplatina. O WNT7A tem sido associado com a regulação não-canônica de FZD9, resultando em uma ação antitumorigênica (SMITH et al., 2022). Nesse sentido, mesmo que haja um efeito positivo do tamoxifeno na diminuição de FZD9, haveria um efeito negativo no sentido de levar à diminuição do ligante WNT7A, com isso, perder o

efeito que poderia ser proporcionado por WNT7A/FZD9. Desse modo, uma abordagem que pudesse não necessariamente diminuir FZD9, mas redirecionar seu efeito para um perfil antitumorigênico, se faz necessário e é o que tem sido abordado pelo trabalho de Sompel e colaboradores (2022) por meio do uso do iloprosta (SOMPEL et al., 2022).

Na análise de IHC, observamos que em muitos dos casos positivos, há uma evidente marcação de FZD9 nas bordas tumorais. Hipotetizamos que a presença do FZD9 na borda tumoral (Figura 20D) possa ser um fator importante para a manutenção da atividade proliferativa, uma vez que essa região possui maior atividade metabólica e acesso aos nutrientes, comparado com as células da região mais central do ambiente tumoral (JIMÉNEZ-SÁNCHEZ et al., 2021). Uma outra característica interessante da análise IHC, é a marcação citoplasmática do FZD9, também identificado no trabalho de Hachim e seus colegas, embora não discutido (HACHIM et al., 2020). O FZD9 é conhecido por ser um dos membros que compõe a família dos frizzled, caracterizados por serem proteínas de múltiplas passagens na membrana plasmática. Nesse sentido, espera-se uma marcação IHC funcional exclusivamente membranar. Uma possível explicação para a positividade de FZD9 em nível citoplasmático é o que tem sido debatido para outros membros da família, como o FZD4 e FZD5, onde é sugerida sua internalização mediada por via endossômica dependente de clatrina, o que induziria a cascata de reações subsequentes (YAMAMOTO; KOMEKADO; KIKUCHI, 2006; YU et al., 2007). Outro aspecto interessante relacionado com a análise IHC é a marcação de FZD9 em vasos sanguíneos, apesar de não ser possível identificar se se tratam de vasos neoformados ou preexistentes à formação do tumor. Para isso, um estudo aprofundado deve ser conduzido, especialmente com amostras completas de tecido tumoral e não tumoral. Além do mais, o GTEX demonstra que o tecido muscular esquelético em condições normais apresenta altos níveis de FZD9. Devido às regulações relacionadas com o cálcio intracelular, especulamos uma possível participação nesse sentido. Os vasos sanguíneos, por sua vez, possuem músculo liso, não abordado no GTEX. Porém possuem mecanismos cálcio-dependentes via calmodulina, que é ativada por cálcio (PASCUAL-VARGAS; SALINAS, 2021). Vale ressaltar aqui que na via não-canônica/cálcio dependente, os membros da família frizzled podem contribuir com a regulação de proteínas que levam a ativação da calmodulina.

Até o momento poucos estudos investigaram o papel desse membro frizzled. Nesse sentido, conduzimos ensaios *in vitro* e avaliação por RT-qPCR para identificar linhagens celulares com alta expressão de FZD9 e selecioná-las como modelos experimentais para análises por CRISPR. A linhagem HeLa, apesar de expressar baixos níveis de FZD9 foi selecionada inicialmente para validação de um modelo experimental devido às suas características de rápida e eficiente recuperação após tratamento com os antibióticos blasticidina e zeocina. A inserção dos vetores virais: dCas9-KRAB-MeCP2, seguido do sgRNA(MS2)\_zeo\_backbone, este último contendo o *guide* do promotor 1, promotor 2, CDS 1, CDS 2 ou CDS3 (Tabela 2) foram transduzidos conjuntamente nas células alvo (mama ou cérvix uterina), com o intuito de reduzir a expressão do FZD9. As células HeLa apresentaram uma redução de mais de 50% dos níveis de transcritos do FZD9, sendo submetidas em seguida para ensaios funcionais. A redução da capacidade de proliferação celular encontrada em nossos achados é condizente com o estudo de Fujimoto e colaboradores (2009). Os autores utilizaram siRNA para inibir o FZD9 em linhagem de células de hepatoma e também em HeLa (TOMIZAWA, 2009). Em outro ensaio, após redução do FZD9, observamos diminuição na eficiência de formação de colônias em baixa densidade. Além disso, o tamanho das colônias foi inferior comparado ao vetor vazio. Isso se deve, provavelmente, à diminuição de FZD9 como receptor transmembranar em relação aos seus possíveis ligantes canônicos. Desta forma, as colônias do vetor vazio apresentam uma área maior por possuírem mais FZD9 e conseqüentemente maior ativação mediada por seus ligantes, o que levaria à proliferação destas células e por conseqüência à formação de uma área maior. Embora os resultados em HeLa tenham sido animadores, não foi possível, utilizando as mesmas condições, realizar os experimentos em linhagens tumorais de mama. Dentro dessas mesmas condições, repetimos o experimento em linhagens MDA-MB-453 e C33A, contudo os níveis transcricionais e proteicos de FZD9 foram restabelecidos após 4 dias à recuperação do tratamento com antibiótico de seleção.

O FZD9 é uma proteína transmembranar que funciona como receptor para ligantes WNT. Diferentes ligantes já foram associados ao FZD9, gerando sinalizações pró ou antitumorais. Em células 293T, o Wnt2 funciona como um ligante do Fzd9 sinalizando para proteínas de sua via de transdução, o que leva ao acúmulo de  $\beta$ -catenina e, por conseqüente, maiores níveis de proliferação celular



(KARASAWA et al., 2002). O Wnt5, em células neuronais, age como um fator de crescimento secretado, regulando a formação de espinhas neuronais em hipocampo de roedores. O FZD9 forma um complexo pré-acoplado com G $\alpha$  (subunidade da proteína G), o qual é rompido após ligação do Wnt5a. Outro mediador, o G $\beta\gamma$  é necessário para aumento de níveis de cálcio no citoplasma celular e na espinogênese. Esse processo também é mediado pelo Wnt5a (RAMÍREZ et al., 2016). No câncer de pulmão de células não pequenas, o Wnt7a liga-se ao FZD9 mediando efeitos antitumorígenicos que, aparentemente, estão associados à proteína G. Este evento promoveria a ativação de uma cascata alternativa, que inclui PPAR $\gamma$  e regulação de NF-KappaB (WINN et al., 2006). No câncer de mama, baixos níveis de WNT5A ou WNT7A foram descritos como preditores de pior sobrevida (YI et al., 2017; ZHONG et al., 2016). Esses dados da literatura, somados com nossas análises conduzidas no IPA, nos conduziram a avaliar a expressão destes ligantes, inclusive após tratamento com tricostatina (TSA) e 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabina). Observamos que ambos os fármacos induziram uma diminuição de FZD9 e aumento de WNT5A e WNT7A em BT-549. Esses resultados sugerem um possível mecanismo epigenético associado aos fatores reguladores da expressão de FZD9, bem como de conhecidos ligantes não-canônicos da via. A linhagem BT-549 é classificada como mesenquimal, enquanto a MDA-MB-453 é LAR (ESPINOSA FERNANDEZ et al., 2020). Por terem classificações diferentes, os resultados encontrados em nosso estudo podem ser discordantes, pois mecanismos moleculares distintos poderiam estar associados. Além disso, a dosagem suportada por cada modelo celular foi diferente, o que pode ter colaborado para esses resultados discrepantes. Contudo, os resultados são animadores por se assemelharem ao que tem sido investigado em câncer de pulmão e tratamento com iloprostá. Além do mais, ambas as drogas reduziram FZD9, fato que pode vir a ser interessante ao somar com terapias disponíveis ao perfil do paciente. É esperado que a redução do FZD9 seja capaz de sensibilizar essas células ao tratamento com cisplatina.

Tanto a TSA quanto a decitabina tem sido estudada para o tratamento de pacientes com TNBC e nTNBC, nos quais distintos mecanismos estão envolvidos. O grupo de Wang (2020), por exemplo, identificou aumento de E-caderina e diminuição de vimentina em células MCF7 após tratamento com TSA (WANG et al., 2020). Já o grupo de Song (2018) conduziu experimentos em linhagens TNBC e

após tratar com TSA observou diminuição dos níveis de CYCLIN D1, CDK4, CDK6 e BCL-XL e aumento de P21. Em combinação com doxorrubicina foi identificado um efeito sinérgico que resultou em inibição da proliferação das linhagens HCC1806 e HCC38 (SONG et al., 2018). A 5-aza tem sido estudada como um potencial fármaco para o tratamento de subtipos do câncer de mama. Em pacientes HER2+ resistentes ao tratamento com trastuzumab a 5-aza aparece como promissor potencializador da doxorrubicina (BUOČIKOVA et al., 2022). Em linhagem MDA-MB-231, negativa para ER, o tratamento com 5-aza foi capaz de restaurar a expressão de receptores de estrógeno (SALAHUDDIN et al., 2022). Interessantemente, efeitos pró-apoptóticos mediados por cisplatina foram aumentados após tratamento em linhagens TNBC com decitabina (NAKAJIMA et al., 2022). Apesar desses significativos avanços, nem todas as linhagens de cânceres de mama respondem de modo similar, seja no tratamento com decitabina ou com a TSA. Nesse sentido, o FZD9 pode vir a ser um biomarcador promissor para auxiliar na detecção de candidatos a receberem tais terapias, além de poder contribuir para entender o efeito do tratamento sobre a paciente, uma vez que seus níveis sofrem alteração em função da administração da droga.

Nossos resultados indicam que o FZD9 tem um papel prognóstico promissor, além de ser importante na capacidade de crescimento celular, de migração e formação de colônias. Outros ensaios são necessários para confirmar o papel de FZD9 na proliferação, migração e invasão, incluindo o uso de outros modelos celulares previstos no escopo do nosso estudo.

## 6. CONCLUSÕES

- O FZD9 está diferencialmente entre populações de tumores de mama não triplo-negativo (nTNBC) de triplo negativo (TNBC). O aumento de FZD9 foi observado nas pacientes com TNBC.
- O perfil de expressão de FZD9 se manteve reprodutível em diferentes populações de pacientes com câncer de mama. É altamente expresso em pacientes com câncer de mama receptores hormonais negativos.
- Os TNBC/basal-like exibem maior expressão transcricional de FZD9 e menor nível de metilação.
- A Alta expressão de FZD9 em níveis transcricionais e proteicos esta associada com pior sobrevida de pacientes com câncer de mama.
- Linhagens celulares TNBC apresentam níveis elevados de FZD9.
- A 5-aza-2'deoxyctidine (decitabina) e a tricostatina A reduziram os níveis de expressão de FZD9 em linhagens celulares TNBC.
- Houve redução da capacidade de duplicação celular, de migração e formação de colônia em células HeLa após inibição de FZD9 por iCRISPR/Cas9.

## 6. REFERÊNCIAS

ABDUL RAHMAN, H. et al. Upregulation of SOX-2, FZD9, Nestin, OCT-4 and FGF-4 expression in human chorion derived-stem cells after angiogenic induction. **The Medical journal of Malaysia**, v. 63 Suppl A, p. 57–58, 2008.

ACHILLE, N. J. et al. Association between early promoter-specific DNA methylation changes and outcome in older acute myeloid leukemia patients. **Leukemia Research**, v. 42, p. 68–74, mar. 2016.

ALEXANDROU, S. et al. The Proliferative and Apoptotic Landscape of Basal-like Breast Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, 4 fev. 2019.

ALLRED, D. C.; MOHSIN, S. K.; FUQUA, S. A. W. **Histological and biological evolution of human premalignant breast disease**. *Endocrine-Related Cancer. Anais...*2001.

AMIN, N.; VINCAN, E. The Wnt signaling pathways and cell adhesion. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 2, p. 784–804, 1 jan. 2012.

ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 1, p. 11–26, 21 jan. 2013.

ARPS, D. P. et al. Invasive ductal carcinoma with lobular features: a comparison study to invasive ductal and invasive lobular carcinomas of the breast. **Breast Cancer Res Treat**, v. 138, n. 3, p. 719–726, 2013.

BARROSO-SOUSA, R.; METZGER-FILHO, O. **Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: Results and therapeutic implications**. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2016.

BENEVOLENSKAYA, E. V. et al. DNA methylation and hormone receptor status in breast cancer. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 17, 16 dez. 2016.

BUOČIKOVA, V. et al. Decitabine potentiates efficacy of doxorubicin in a preclinical trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 147, p. 112662, mar. 2022.

BURSTEIN, M. D. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1688–1698, 1 abr. 2015.

CEDOLINI, C. et al. Type of breast cancer diagnosis, screening, and survival. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 4, p. 235–240, ago. 2014.

CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio 2012.

CHAILANGKARN, T. et al. A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 338–343, 10 ago. 2016.

CHEN, J. et al. Up-regulation of Wnt7b rather than Wnt1, Wnt7a, and Wnt9a indicates poor prognosis in breast cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 11, n. 9, p. 4552–4561, 2018.

CHO, E. et al. A Multigene Model for Predicting Tumor Responsiveness After Preoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. **International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics**, v. 105, n. 4, p. 834–842, nov. 2019.

CHO, N. Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer. **Ultrasonography**, v. 35, n. 4, p. 281–288, 1 out. 2016.

CONWAY, K. et al. DNA methylation profiling in the Carolina Breast Cancer Study defines cancer subclasses differing in clinicopathologic characteristics and survival. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 450, 7 out. 2014.

DAMALAS, A. et al. Deregulated  $\beta$ -catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. **EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4912–4922, 3 set. 2001.

DE, P. et al. Wnt-beta-catenin pathway signals metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 43124–43149, 2016.

DUCHARTRE, Y.; KIM, Y. M.; KAHN, M. **The Wnt signaling pathway in cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology** Elsevier Ireland Ltd, , 1 mar. 2016.

EL-SHINAWI, M. et al. Inflammatory and Non-inflammatory Breast Cancer: A Potential Role for Detection of Multiple Viral DNAs in Disease Progression. **Annals of Surgical Oncology**, v. 23, n. 2, p. 494–502, 27 fev. 2016.

ESPINOSA FERNANDEZ, J. R. et al. Identification of triple-negative breast cancer cell lines classified under the same molecular subtype using different molecular characterization techniques: Implications for translational research. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0231953, 30 abr. 2020.

F. BRAY et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2018.

FEKETE, J. T.; GYÖRFFY, B. ROCplot.org: Validating predictive biomarkers of chemotherapy/hormonal therapy/anti-HER2 therapy using transcriptomic data of 3,104 breast cancer patients. **International journal of cancer**, v. 145, n. 11, p. 3140–3151, 1 dez. 2019.

FODDE, R. The APC gene in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 7, p. 867–871, 2002.

FRAGOMENI, S. M.; SCIALLI, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, jan. 2018.

GAO, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, 2 abr. 2013.

GHONCHEH, M. et al. Epidemiology, Incidence and Mortality of Breast Cancer in Asia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. sup3, p. 47–52, 2016.

GINTER, P. S.; D'ALFONSO, T. M. Current Concepts in Diagnosis, Molecular Features, and Management of Lobular Carcinoma In Situ of the Breast With a Discussion of Morphologic Variants. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 12, p. 1668–1678, 30 dez. 2017.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary

Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, set. 2013.

GYÖRFFY, B. et al. **An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients.** **Breast Cancer Research and Treatment**, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020197>>. Acesso em: 16 fev. 2020

HACHIM, M. Y. et al. M1 Polarization Markers Are Upregulated in Basal-Like Breast Cancer Molecular Subtype and Associated With Favorable Patient Outcome. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 16 nov. 2020.

HAFFTY, B. G. et al. Locoregional Relapse and Distant Metastasis in Conservatively Managed Triple Negative Early-Stage Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5652–5657, 20 dez. 2006.

HAN, B. et al. FOXC1-induced non-canonical WNT5A-MMP7 signaling regulates invasiveness in triple-negative breast cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 10, p. 1399–1408, 1 mar. 2018.

HAN, M. S.; KHAN, S. A. Clinical Trials for Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 23, n. 4, p. 293–301, 11 dez. 2018.

HARB, J.; LIN, P. J.; HAO, J. **Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics.** **Current Oncology Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 fev. 2019.

HEILMANN, A. et al. The Wnt Serpentine Receptor Frizzled-9 Regulates New Bone Formation in Fracture Healing. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84232, 31 dez. 2013.

HOADLEY, K. A. et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 291- 304.e6, abr. 2018.

HUANG, H.-C.; KLEIN, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. **Genome Biology**, v. 5, n. 7, p. 234, 2004.

INCA. **Estimativa — Instituto Nacional de Câncer - INCA**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

JÉZÉQUEL, P. et al. bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 131, n. 3, p. 765–775, fev. 2012.

JÉZÉQUEL, P. et al. bc-GenExMiner 3.0: New mining module computes breast cancer gene expression correlation analyses. **Database**, v. 2013, 2013.

JHAN, J. R.; ANDRECHEK, E. R. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. **Pharmacogenomics**, v. 18, n. 17, p. 1595–1609, nov. 2017.

JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, J. et al. Evolutionary dynamics at the tumor edge reveal metabolic imaging biomarkers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, 9 fev. 2021.

JUUL, N. et al. Assessment of an RNA interference screen-derived mitotic and ceramide pathway metagene as a predictor of response to neoadjuvant paclitaxel for primary triple-negative breast cancer: a retrospective analysis of five clinical trials. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 4, p. 358–365, abr. 2010.

KARASAWA, T. et al. Frizzled-9 Is Activated by Wnt-2 and Functions in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37479–37486, out. 2002.

KASTRATI, I. et al. The NF- $\kappa$ B Pathway Promotes Tamoxifen Tolerance and Disease Recurrence in Estrogen Receptor–Positive Breast Cancers. **Molecular Cancer Research**, v. 18, n. 7, p. 1018–1027, 1 jul. 2020.

KEMP, C. R. et al. Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 7, p. 2011–2019, jul. 2007.

KIRIKOSHI, H.; SEKIHARA, H.; KATOH, M. Expression profiles of 10 members of Frizzled gene family in human gastric cancer. **International journal of oncology**, v. 19, n. 4, p. 767–771, 2001.



KNIPPSCHILD, U. et al. **The role of the casein kinase 1 (CK1) family in different signaling pathways linked to cancer development.** *Onkologie*, , set. 2005.

LEE, B. T. et al. The UCSC Genome Browser database: 2022 update. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D1115–D1122, 7 jan. 2022.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 1 jul. 2011.

LEHMANN, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 16 jun. 2016.

LIM, X.; NUSSE, R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, fev. 2013.

LUQUE-CABAL, M. et al. Mechanisms behind the resistance to trastuzumab in HER2-amplified breast cancer and strategies to overcome it. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 10, n. Suppl 1, p. 21–30, 2016.

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, n. 1, p. 23–31, 2015.

MATSUDA, N. et al. Identification of frequent somatic mutations in inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 163, n. 2, p. 263–272, 27 jun. 2017.

MAZZONI, S. M.; FEARON, E. R. **AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers.** *Cancer Letters* Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2014.

MEDIMEGH, I. et al. MicroRNAs expression in triple negative vs non triple negative breast cancer in Tunisia: Interaction with clinical outcome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111877, 2014.

MEDYOUF, H.; GHYSDAEL, J. **The calcineurin/NFAT signaling pathway: A novel therapeutic target in leukemia and solid tumors.** *Cell Cycle* Taylor and Francis Inc., , 1 fev. 2008.

MILIOLI, H. H. et al. Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes. **BMC Medical Genomics**, v. 10, n. 1, p. 19, 28 dez. 2017.

MOREIRA, A. S. L.; CUNHA, T. M.; ESTEVES, S. Cervical cancer recurrence – can we predict the type of recurrence? **Diagnostic and Interventional Radiology**, v. 26, n. 5, p. 403–410, 1 set. 2020.

NAGINI, S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 152–163, 12 jan. 2017.

NAKAJIMA, W. et al. Epigenetic Priming with Decitabine Augments the Therapeutic Effect of Cisplatin on Triple-Negative Breast Cancer Cells through Induction of Proapoptotic Factor NOXA. **Cancers**, v. 14, n. 1, p. 248, 4 jan. 2022.

PASCUAL-VARGAS, P.; SALINAS, P. C. A Role for Frizzled and Their Post-Translational Modifications in the Mammalian Central Nervous System. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 3 ago. 2021.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000.

POHL, S. G. et al. **Wnt signaling in triple-negative breast cancer.** **Oncogenesis** Nature Publishing Group, , 3 abr. 2017.

POLAKIS, P. Wnt signaling in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 5, p. 9, maio 2012.

POLYAK, K. **Breast cancer: Origins and evolution.** **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, , nov. 2007.

PULVIRENTI, T. et al. Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. **Cancer Research**, v. 71, n. 23, p. 7280–7290, 1 dez. 2011.

RAMÍREZ, V. T. et al. Wnt-5a/Frizzled9 Receptor Signaling through the Gαo-Gβγ Complex Regulates Dendritic Spine Formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 36, p. 19092–19107, set. 2016.

RAMOS-SOLANO, M. et al. Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration. **Experimental Cell Research**, v. 335, n. 1, p. 39–50, jul. 2015.

SAITOH, T.; KATOH, M. Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNF $\alpha$  in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells. **International journal of molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. 345–349, 2002.

SALAHUDDIN, A. et al. Epigenetic restoration and activation of ER $\beta$ : an inspiring approach for treatment of triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 39, n. 10, p. 150, 18 jul. 2022.

SANTUARIO-FACIO, S. K. et al. A New Gene Expression Signature for Triple-Negative Breast Cancer using Frozen Fresh Tissue before Neoadjuvant chemotherapy. **Molecular Medicine**, v. 23, n. 1, p. 101–111, 4 jan. 2017.

SEMBA, T. et al. Concise review: JNK signaling in stem cell self-renewal and differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, 1 abr. 2020.

SHAKOORI, A. et al. Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 4, p. 1365–1373, 9 set. 2005.

SHANG, M. et al. Potential Management of Circulating Tumor DNA as a Biomarker in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 24, p. 4627–4634, 2018.

SMITH, A. J. et al. miR-520a-5p regulates Frizzled 9 expression and mediates effects of cigarette smoke and iloprost chemoprevention. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2388, 11 fev. 2022.

SOCIETY, A. C. Breast Cancer Facts & Figures 2018-2019. **Side Effects of Medical Cancer Therapy: Prevention and Treatment: Second Edition**, 2018.

SOMPTEL, K. et al. Iloprost requires the Frizzled-9 receptor to prevent lung cancer. **iScience**, v. 25, n. 6, p. 104442, jun. 2022.

SONG, X. et al. Trichostatin A inhibits proliferation of triple negative breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis. **Neoplasma**, v. 65, n. 06, p. 898–906, 2018.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TEPEKOY, F.; AKKOYUNLU, G.; DEMIR, R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 3, p. 337–346, 18 mar. 2015.

THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY. All Cancers. **Globocan**, 2018.

TOMIZAWA. SiRNA of Frizzled-9 suppresses proliferation and motility of hepatoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 35, n. 4, 1 set. 2009.

TRAN, H. T. T. et al. Improved Therapeutic Effect against Leukemia by a Combination of the Histone Methyltransferase Inhibitor Chaetocin and the Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A. **Journal of Korean Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 237, 2013.

UMBHAUER, M. The C-terminal cytoplasmic Lys-Thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 18, p. 4944–4954, 15 set. 2000.

VAN AMERONGEN, R.; BOWMAN, A. N.; NUSSE, R. Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ $\beta$ -catenin- responsive stem cells in the mammary gland. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 3, p. 387–400, 7 set. 2012.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, 31 jul. 2014.

WANG, J. et al. Expression of C-myc and  $\beta$ -catenin and their correlation in triple negative breast cancer. **Minerva Medica**, v. 108, n. 6, p. 513–517, 1 dez. 2017a.

WANG, Q. et al. Involvement of c-Fos in cell proliferation, migration, and invasion in osteosarcoma cells accompanied by altered expression of Wnt2 and Fzd9. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017b.

WANG, X. et al. Trichostatin A reverses epithelial-mesenchymal transition and attenuates invasion and migration in MCF-7 breast cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 3 jan. 2020.

WANG, Y. et al. A Large Family of Putative Transmembrane Receptors Homologous to the Product of the Drosophila Tissue Polarity Gene frizzled. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4468–4476, fev. 1996.

WANG, Y. K. et al. A novel human homologue of the Drosophila frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 3, p. 465–472, 1 mar. 1997.

WANG, Z.; LI, Z.; JI, H. **Direct targeting of  $\beta$ -catenin in the Wnt signaling pathway: Current progress and perspectives. Medicinal Research Reviews** John Wiley and Sons Inc, , 2021.

WINN, R. A. et al. Restoration of Wnt-7a Expression Reverses Non-small Cell Lung Cancer Cellular Transformation through Frizzled-9-mediated Growth Inhibition and Promotion of Cell Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19625–19634, maio 2005.

WINN, R. A. et al. Antitumorigenic Effect of Wnt 7a and Fzd 9 in Non-small Cell Lung Cancer Cells Is Mediated through ERK-5-dependent Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 26943–26950, set. 2006.

WODARZ, A.; NUSSE, R. **Mechanisms of Wnt signaling in development. Annual Review of Cell and Developmental Biology** Annu Rev Cell Dev Biol, , 1998.

WONG, S. M. et al. Breast cancer prevention strategies in lobular carcinoma in situ: A decision analysis. **Cancer**, v. 123, n. 14, p. 2609–2617, 15 jul. 2017.

WOODS, R. W. et al. A Review of Options for Localization of Axillary Lymph Nodes in the Treatment of Invasive Breast Cancer. **Academic Radiology**, ago. 2018.

XIAO, Q. et al. Cross-Talk between p53 and Wnt Signaling in Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 453, 15 mar. 2022.

YAMAMOTO, H.; KOMEKADO, H.; KIKUCHI, A. Caveolin Is Necessary for Wnt-3a-Dependent Internalization of LRP6 and Accumulation of  $\beta$ -Catenin. **Developmental Cell**, v. 11, n. 2, p. 213–223, ago. 2006.

YANG, Y. **Wnt signaling in development and disease**. **Cell and BioscienceBioMed Central**, , 20 abr. 2012.

YI, K. et al. Wnt7a Deficiency Could Predict Worse Disease-Free and Overall Survival in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 20, n. 4, p. 361, 2017.

YU, A. et al. Association of Dishevelled with the Clathrin AP-2 Adaptor Is Required for Frizzled Endocytosis and Planar Cell Polarity Signaling. **Developmental Cell**, v. 12, n. 1, p. 129–141, jan. 2007.

ZACARÍAS-FLUCK, M. F. et al. The Wnt signaling receptor Fzd9 is essential for Myc-driven tumorigenesis in pancreatic islets. **Life Science Alliance**, v. 4, n. 5, p. e201900490, 2 maio 2021.

ZAGAMI, P.; CAREY, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **npj Breast Cancer**, v. 8, n. 1, p. 95, 20 ago. 2022a.

ZAGAMI, P.; CAREY, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **npj Breast Cancer**, v. 8, n. 1, p. 95, 20 ago. 2022b.

ZENG, C. M.; CHEN, Z.; FU, L. **Frizzled receptors as potential therapeutic targets in human cancers**. **International Journal of Molecular SciencesMDPI AG**, , 22 maio 2018.

ZHANG, M.; LEE, A. V; ROSEN, J. M. The cellular origin and evolution of breast cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, 2017.

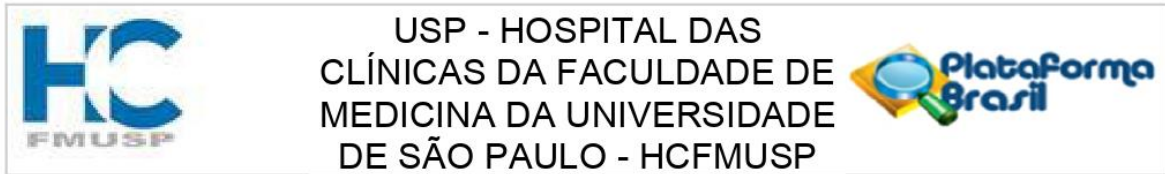
ZHANG, Y. et al. Methylation status of the promoter region of the human frizzled 9 gene in acute myeloid leukemia. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 2, p. 1339–1344, ago. 2016.

ZHANG, Z. et al. Upregulation of frizzled 9 in astrocytomas. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, n. 6, p. 615–624, dez. 2006.

ZHONG, Z. et al. Decreased Wnt5a Expression is a Poor Prognostic Factor in Triple-Negative Breast Cancer. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1–7, 1 jan. 2016.

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 26 fev. 2021.

## ANEXO 1



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise funcional do receptor Frizzled classe 9 (FZD9) em linhagens provenientes de tumores de mama triplo-negativos e cânceres cervicais

**Pesquisador:** Lara Termini

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 51434121.6.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.995.205

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo in vitro utilizando linhagens celulares provenientes de tumores de mama e de cérvix uterina que será realizado no ICESP.

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar os efeitos do nocaute do FZD9 em linhagens celulares representativas de tumores de mama triplo-negativos e de tumores cervicais; Caracterizar o perfil de expressão do FZD9 em diferentes linhagens de células representativas de tumores de mama triplo-negativos e de tumores cervicais; células HS578T, MDA-MB-468, SIHA e C33A nocauteadas para FZD9; Avaliar a eficiência do nocaute; Avaliar o efeito do nocaute na viabilidade, proliferação, formação de colônia, ensaio de apoptose, migração e invasão celular.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Estudo de baixo risco, será desenvolvido em laboratório de nível de biossegurança 1 (NB1).

Benefícios: O entendimento do papel de FZD9 em tumores de mama triplo-negativos e em tumores cervicais poderão auxiliar na melhor compreensão destes tumores bem como em uma melhor caracterização destes. O estudo do FZD9 poderá subsidiar o entendimento do comportamento desses tumores bem como estudos futuros que busquem alvos específicos para

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

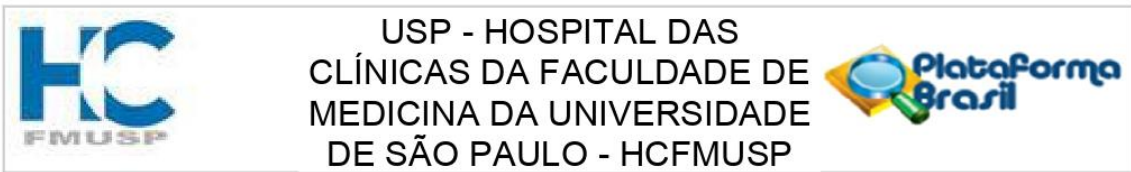
**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 4.995.205

novas terapias.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo onde os ensaios funcionais esclarecerá sobre a participação desse gene na proliferação, migração e invasão celular. Analisará os efeitos do nocaute do FZD9 em linhagens celulares representativas de tumores de mama triplo-negativos e tumores cervicais. A pesquisa será realizada in silico e estudo in vitro com utilização de modelos

celulares comercializados pela ATCC. Não haverá participantes para este estudo, seja de modo direto ou indireto. Não serão utilizados dados de prontuários, nem aplicação de questionários ou uso de material biológico de paciente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Solicita dispensa do TCLE, pois o estudo in vitro utilizará apenas linhagens celulares comercializadas pela ATCC (ATCC: The Global Bioresource Center, <https://www.atcc.org/>).

Nenhuma amostra de paciente ou participação direta ou indireta será utilizada nesse estudo.

**Recomendações:**

Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há

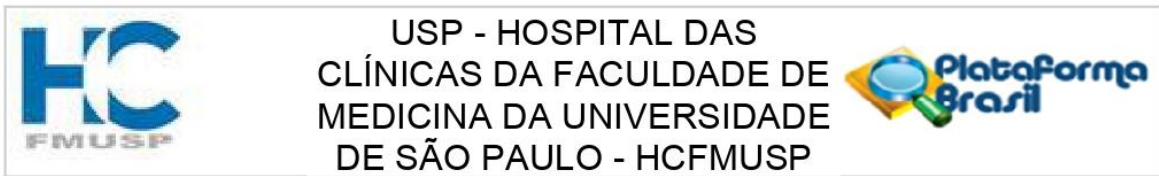
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1765293.pdf	01/09/2021 12:39:22		Aceito
Outros	5.pdf	01/09/2021 12:35:16	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.995.205

Outros	4.pdf	01/09/2021 12:34:56	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Outros	3.pdf	01/09/2021 12:34:37	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2.pdf	01/09/2021 12:34:07	DANIEL RODRIGUES DE BASTOS	Aceito
Outros	1.pdf	01/09/2021 12:33:04	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Outros	AprovacaoCIBIO.pdf	01/09/2021 12:30:10	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Folha de Rosto	FrLara21360.pdf	01/09/2021 12:27:23	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Parecer Anterior	EstudosInstitucionaisParecer.pdf	28/05/2021 20:10:22	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_FZD9_CEP_cibio.docx	28/05/2021 20:08:38	DANIEL RODRIGUES DE BASTOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

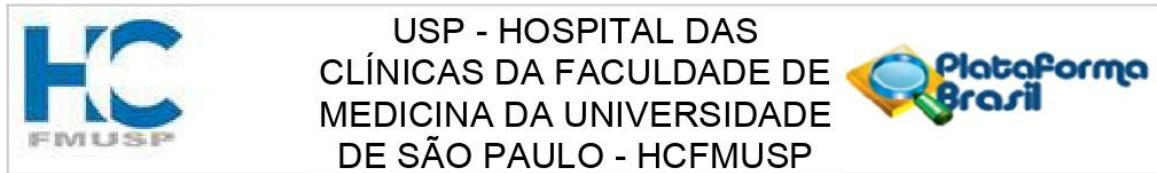
SAO PAULO, 24 de Setembro de 2021

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## ANEXO 2



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico.

**Pesquisador:** Lara Termini

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 51434121.6.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.754.913

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de inclusão de tecnologia de detecção do biomarcador no projeto, a imunohistoquímica. Brochura do investigador foi corrigida.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudo do receptor Frizzled classe 9 (FZD9), um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Inalterados

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Adequada e pertinente

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Inalterados

**Recomendações:**

Aprovação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

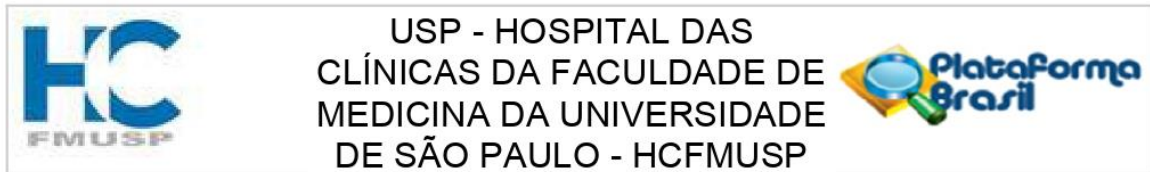
Nenhuma

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.754.913

**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_2026919_E1.pdf	03/11/2022 14:33:30		Aceito
Outros	FORMULARIO_PARA_SUBMISSAO_D E_EMENDAS_E_BROCHURAS.pdf	03/11/2022 14:32:31	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	prejeto.docx	03/11/2022 11:36:09	DANIEL RODRIGUES DE BASTOS	Aceito
Outros	Objetivodaemenda.docx	04/10/2022 10:59:40	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Parecer Anterior	PBPARECERCONSUBSTANCIADO CO NEP1929933Cervical.pdf	04/10/2022 10:59:02	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Parecer Anterior	PBPARECERCONSUBSTANCIADO CE P3831830Aprov11fev20Endometrio.pdf	04/10/2022 10:58:36	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Parecer Anterior	ParecerConsubstanciado29814Mama.pdf	04/10/2022 10:58:22	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Parecer Anterior	aprovacaoextensaoCEPCervical.pdf	04/10/2022 10:58:01	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Outros	5.pdf	01/09/2021 12:35:16	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Outros	4.pdf	01/09/2021 12:34:56	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Outros	3.pdf	01/09/2021 12:34:37	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2.pdf	01/09/2021 12:34:07	DANIEL RODRIGUES DE BASTOS	Aceito
Outros	1.pdf	01/09/2021 12:33:04	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Outros	AprovacaoCIBIO.pdf	01/09/2021 12:30:10	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Folha de Rosto	FrLara21360.pdf	01/09/2021 12:27:23	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Parecer Anterior	EstudosInstitucionaisParecer.pdf	28/05/2021 20:10:22	DANIEL RODRIGUES DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_FZD9_CEP_cibio.docx	28/05/2021 20:08:38	DANIEL RODRIGUES DE BASTOS	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

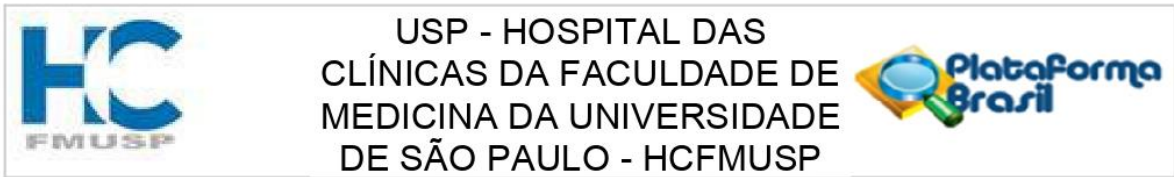
**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.754.913

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 11 de Novembro de 2022

---

**Assinado por:**  
**Joel Faintuch**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

**ANEXO 3**

Departamento de Radiologia e  
Oncologia  
Av. Dr Arnaldo, 251 - 8º andar  
CEP 01246-000  
São Paulo - SP

**CIBio**  
Comissão Interna  
de Biossegurança

**RADIOLOGIA  
ONCOLOGIA**

---

**APROVAÇÃO**

*CQB: 084/98*

A Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados do Departamento de Radiologia e Oncologia **APROVOU** na reunião de 05-07-2021 o Protocolo de Pesquisa nº 140/2021 para o Nível de Biossegurança **NB1** intitulado: **“Análise funcional do receptor Frizzled classe 9 (FZD9) em linhagens provenientes de tumores de mama triplo-negativos e cânceres cervicais”**, apresentado pelo(a) pesquisador(a) Lara Termini, do Departamento de Laboratório de Inovação em Câncer (CMN-ICESP).

São Paulo, 05 de Julho de 2021

---

Prof Dr Bryan Eric Strauss

Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
em Organismos Geneticamente Modificados  
Departamento de Radiologia e Oncologia