

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

**VALOR PROGNÓSTICO E PREDITIVO DE GENES CANDIDATOS
SELECIONADOS APÓS ANÁLISE DE *OLIGOARRAY* EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS**

RENATA CAMARGO BUENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU-SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

**VALOR PROGNÓSTICO E PREDITIVO DE GENES CANDIDATOS
SELECIONADOS APÓS ANÁLISE DE *OLIGOARRAY* EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS**

Mestranda: Renata Camargo Bueno

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

Co-orientadora: Dra. Sandra Drigo Linde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU-SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Bueno, Renata Camargo.

Valor prognóstico e preditivo de genes candidatos selecionados após análise de *oligoarrays* em carcinomas mamários / Renata Camargo Bueno.
– Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Silvia Regina Rogatto

Coorientador: Sandra Aparecida Drigo Linde

Capes: 40105008

1. Mamas – Câncer. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Anatomia patológica.

Palavras-chave: *ATM*; Carcinomas mamários; Expressão gênica; Imunoistoquímica; MicroRNAs; Marcadores prognósticos; PCR quantitativa em tempo real.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Paulo Roberto, que
são meu exemplo, base, força, alegria e a quem tenho
muita admiração e amor!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Dra. Silvia Regina Rogatto, por ter aberto as portas da sua equipe para mim, pelos ensinamentos e paciência durante meu processo de aprendizagem, por toda a ajuda e incentivo durante este tempo de convivência e por ser esse exemplo de garra, persistência e determinação admiráveis.

À minha co-orientadora, Dra. Sandra Drigo Linde, essa pessoa de coração tão puro, batalhadora, amiga, que ajudou durante todas as etapas deste estudo e sempre ensinando com uma paciência e dedicação inigualáveis. Uma pessoa com quem tive o prazer de conviver e aprender não apenas sobre pesquisa, como também sobre a vida.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho, pelas portas que foram abertas, calma nos momentos de dificuldades, clareza nos momentos de decisões, alegrias, saúde, e por não tornar minha vida tão fácil, a ponto de que eu não desse o valor que ela realmente merece, e nem tão difícil, a ponto de eu conseguir enfrentar e amadurecer bastante com as dificuldades encontradas;

Aos meus pais, Maria do Carmo e Paulo Roberto, a tudo que sempre fizeram por mim! Todo o amor, carinho, conselhos, apoio, paciência e pela compreensão nos momentos de ausência durante esta etapa da vida. Vocês me permitiram sonhar, me ensinaram a não desistir deste sonho e a encarar toda e qualquer dificuldade. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Mariana e Fernanda, ao meu cunhado Raphael e meus sobrinhos, João Pedro e Manuela, por todo amor e pelos bons momentos vividos juntos! Amo vocês!

Aos meus avós, Marta ("Vó Marta") e Paulo ("Vô Paulo" - *in memorian*), pelo amor recebido, carinho, cuidados, conselhos. Amo vocês!

Às minhas tias Alda (*in memorian*) e Mariinha (*in memorian*), por toda a participação durante a minha criação e por todo o exemplo de dedicação e fé que vocês sempre tiveram. Espero nos encontrarmos ainda. Amo vocês!

Todos os meus tios e tias, primos e primas, muitos dos quais me ajudaram a chegar aonde cheguei e ajudaram também a batalhar pelos meus sonhos. Obrigada pelo carinho!

Ao Daniel, por todos estes anos de convivência, de apoio, de conselhos, de paciência, de atenção, de companheirismo, de dedicação e de carinho.

Aos meus amigos, que em muitas vezes se tornaram mais virtuais do que reais. Agradeço todo o apoio, todos os momentos de descontração, as risadas e o carinho.

Aos colegas e amigos do Laboratório Neogene: Julia, Carol, Tatiane, Larissa, Sara, Hellen, Mateus, Fernanda, Francine, Juan, Márcia, André, Deborah, Sandra, Ana, Fabio, Graziela, Anderson, Rogério. E aos que já passaram pelo laboratório: Arianne, Cássia, Priscila, Renata, Rodrigo, Fabíola, Luciana, Miriam, Georgia.

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”

(Charles Chaplin)

A todos os pesquisadores que auxiliaram durante este estudo: Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, Dr. Robson Francisco Carvalho, Dr. Fernando Augusto Soares, Dr. José Roberto Fígaro Caldeira, Dr. Francisco Alves Moraes Neto, Dra. Renata de Azevedo Canevari, Dra. Patrícia Pintor dos Reis e Dra. Renée Laufer Amorim.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), aos docentes do Departamento de Patologia e ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Patologia pela estrutura, ensino e formação de excelência.

Ao Hospital do Câncer A.C. Camargo - São Paulo, pela estrutura e suporte para o desenvolvimento deste estudo, e aos funcionários Eloísa, Louise, Vera, Rodrigo, Severino, Sueli e Ivan, por todos os ensinamentos e auxílio.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos que garantiu o apoio financeiro necessário à realização desta dissertação de mestrado.

Ao CNPq, pelo financiamento concedido a este projeto.

E principalmente às pacientes, que depositaram confiança nos nossos estudos e concederam suas amostras na esperança de um futuro melhor.

OBRIGADA!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

(Carl Gustav Jung)

RESUMO

Neste estudo foi proposto (1) validar a assinatura genética de metástase previamente identificada pelo grupo para cinco genes candidatos (*POLR1B*, *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM5* e *ATM*), identificados como centrais em redes biológicas e correlacionar os dados de expressão com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes; (2) confirmar o valor prognóstico do gene *ATM* e o seu mecanismo de regulação pelo miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664, miR-26a, miR-26b e miR-18a. Foi utilizada a metodologia de RT-qPCR em 63 amostras de carcinomas mamários (CM) e 5 de tecido mamário normal. Foram observadas correlações positivas entre os níveis de expressão dos genes detectados pela técnica de microarray e RT-qPCR, embora sem significância estatística. Não foram observadas diferenças significativas na expressão destes genes nos CM quando comparados às amostras de mama normais. Nas comparações entre os níveis de expressão e as características clínicas e histopatológicas pode-se observar que os genes *IKBKB*, *POLR1B* e *PGM5* apresentaram aumento significativo de expressão em tumores ER positivos. Foram observadas diminuições significativas dos transcritos de *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM5* e *ATM* em tumores HER2 positivos; para os genes *PGM5* e *ATM* houve uma diminuição significativa de expressão nos tumores grau III. A análise da expressão proteica do ATM foi realizada por imunoistoquímica em 926 amostras de CM organizadas em quatro plataformas de microarranjos de tecidos. Foi verificada a diminuição da expressão da proteína ATM nos tumores quando comparados com a amostra de tecido mamário normal e sua diminuição estava associada a tumores de alto grau e metástase à distância. Pacientes com tumores ATM-negativos apresentaram diminuição do tempo de sobrevida livre de doença e de sobrevida global. Após a análise multivariada verificou-se que o ATM é um marcador prognóstico independente em CM, e que a expressão deste gene estava associada a um menor risco de desenvolvimento de metástase e morte específica pela doença ($P<0.001$, HR=0.535, e $P<0.001$, HR=0.534, respectivamente). A análise dos miRNAs potencialmente reguladores do gene *ATM* mostrou correlação negativa entre os níveis dos transcritos do *ATM* e do miR-664 ($P=0.035$, $r=-0.293$) e do miR-421 ($P=0.075$ e $r=-0.249$, respectivamente). Foi observada uma diminuição de expressão de miR-26a e miR-26b e aumento do miR-18a nos tumores quando comparados aos controles. Foi detectada expressão diminuída

significativa dos níveis do miR-26a e miR-26b a aumentada do miR-18a nos tumores de alto grau. Entre os tumores ER-negativos foram detectados níveis mais baixos de miR-26a e miR-26b e mais altos de miR-18a. Entre os tumores PR-positivos foi verificada a diminuição significativa dos níveis do miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a enquanto nos tumores HER2-positivos foram detectados um aumento significativo dos níveis de expressão do miR-203 e miR-18a. Análises funcionais e de outros miRNAs possivelmente reguladores do gene ATM serão úteis para a confirmação destes achados. Entre todos os genes testados, o *ATM* foi o único associado a metástase confirmando os achados prévios.

ABSTRACT

The present study aimed: 1) to validate the genetic signatures of metastasis previously detected by our group for five candidate genes (*POLR1B*, *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM5*, and *ATM*), identified as central in biological networks, and to correlate the findings with clinical-histopathological data; 2) to confirm the prognostic value of the *ATM* gene and its mechanism of regulation by miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664, miR-26a, miR-26b and miR-18a. Sixty-three breast carcinomas (BC) samples and 5 normal breast tissue samples were evaluated by RT-qPCR. Positive correlations were observed between the gene expression levels detected by microarray and RT-qPCR, although not statistically significant. There was no significant difference between BC and normal samples. Overexpression of *IKBKB*, *POLR1B*, and *PGM5* genes were significantly associated with ER positive tumours. Significant downexpression of *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM5* and *ATM* transcripts were observed in HER2-positive tumours. *PGM5* and *ATM* downexpression were statistically associated with grade III tumours. ATM protein expression was evaluated by immunohistochemistry in 926 BC samples organized into four tissue microarray platforms. A decreased ATM protein expression was observed in tumours when compared to normal tissue as well as with high grade tumours and distant metastasis. Patients with ATM-negative tumours showed a decrease of disease-free survival and overall survival. After multivariate analysis, ATM revealed to be an independent prognostic marker in BC and have been associated with lower risk of metastasis and death by disease ($P<0.001$, HR=0.535, and $P<0.001$, HR=0.534, respectively). A negative correlation between the transcript levels of *ATM* and the miR-664 ($P=0.035$, $r=-0.293$), and miR-421 ($P=0.075$ e $r=-0.249$, respectively) was verified. The miR-26a and miR-26b downexpression and miR-18a overexpression were significantly detected in tumours in the comparison with normal samples. It was also detected a significant downexpression of both miR-26a and miR-26b and an overexpression of miR-18a in high-grade tumours. Downexpression of miR-26a and miR-26b and overexpression of miR-18a were verified in ER-negative tumours. In PR-positive tumours was observed a significant downexpression of miR-421, miR-576-5p, miR-664 and miR-18a, whereas in HER2-positive tumours was detected a significant overexpression of miR-203 and miR-18a levels. Functional analysis and investigation of

other putative microRNAs ATM-regulators will be useful to confirm these findings. Among all genes evaluated, only ATM confirmed the previous results and its association with metastasis.

SUMÁRIO

Capítulo I	14
Revisão Bibliográfica.....	14
Justificativa.....	32
Objetivos	33
Material e Métodos	34
Resultados	44
Referências Bibliográficas.....	72
 Capítulo II	 82
Abstract	83
Introduction.....	84
Patients and Methods.....	85
Results	88
Discussion	89
Acknowledgements.....	92
References.....	93
Table 1	96
Table 2	98
Table 3	101
Figure 1	102
Figure 2	103
Figure 3	104
Supplemental Table 1	105
Supplemental Table 2	106
Supplemental Table 3	107
Supplemental Table 4	109
 Conclusão	 110
 Anexo	 112
Aprovação do Comitê de Ética.....	112



Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer de mama é o mais comum entre mulheres é o segundo tipo mais comum no mundo, com aproximadamente 1,4 milhões de casos novos por ano. O número de casos novos estimados para o Brasil no ano de 2012 é de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Em particular na Região Sudeste, o carcinoma mamário é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 69 casos novos por 100 mil. A sobrevida média após cinco anos é de 85% na população mundial e de 60% nos países em desenvolvimento (INCA, 2012).

O carcinoma de mama invasivo é uma doença heterogênea na sua apresentação, classificação patológica e curso clínico. A maioria dos tumores é derivada do epitélio ductal mamário, sendo o carcinoma ductal infiltrante o tipo histológico mais comum, compreendendo aproximadamente 75% dos cânceres invasivos (Yerushalmi et al., 2009). Os carcinomas lobulares ocorrem em 5-15% das pacientes, com uma maior frequência em mulheres mais velhas. Apesar destes tumores estarem associados a um fenótipo biológico menos agressivo, a recorrência e a sobrevivência são muito similares àquelas das pacientes com carcinoma ductal infiltrante (Arpino et al., 2004, Yerushalmi et al., 2009). Existem ainda 16 subtipos de carcinomas epiteliais mais raros, como o carcinoma apócrino, cribiforme, micropapilar, entre outros (Yerushalmi et al., 2009). A diversidade no aspecto clínico do câncer de mama é indubitavelmente relacionada às diferenças nas taxas de crescimento do tumor, invasão tumoral, potencial metastático e outros sinais complexos de crescimento celular e sobrevivência (Chang et al., 2005).

Está bem estabelecido que alguns aspectos da heterogeneidade do câncer de mama estão relacionados a diferentes fatores de risco associados à doença. A idade é um fator importante, sendo que a taxa de incidência dos tumores de mama é maior conforme o aumento da idade, onde a maioria dos tumores invasivos de mama é observada em mulheres acima de 55 anos. Embora presentes em uma minoria dos casos, os carcinomas de mama em mulheres jovens (11% em mulheres com idade inferior a 35 anos) costumam apresentar características mais agressivas, sendo questionada a possibilidade desta ser uma doença diferente, com um distinto processo de tumorigênese (Pollán, 2010). Outros fatores também descritos associados ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama são: mulheres com histórico da doença, com parentes próximos que já tiveram a doença, que apresentam tecido mamário denso e

com maior número de ciclos menstruais (associada a menarca precoce e/ou menopausa tardia). Outros fatores de risco associados ao estilo de vida são relatados, tais como: exposição cumulativa a estrógenos e/ou progesterona no epitélio mamário (nuliparidade ou primeiro filho após os 30 anos de idade, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal); consumo de álcool; sobrepeso ou obesidade e sedentarismo. Além disso, um importante fator de risco está associado à presença de genes de predisposição/suscetibilidade, como *BRCA1* e *BRCA2*; *ATM* (Ataxia Telangiectasia), *TP53* (síndrome de Li-Fraumeni); *CHEK2*; *PTEN* (síndrome de Cowden); *STK11* (síndrome de Peutz-Jeghers), *CDH1*, *CASP8*, *CTLA4*, *NBN*, *CYP19A1*, *TERT* e *XRCC3* (American Cancer Society, 2011; Zhang et al., 2011).

O conhecimento atual sugere que a progressão do câncer se dá por uma complexa série de eventos genéticos que levam a vias divergentes e distintas culminando no tumor invasivo, incluindo os mecanismos de manutenção da sinalização da proliferação das células tumorais, evasão dos mecanismos supressores de crescimento e da destruição das células tumorais pelo sistema imune, permitindo a imortalidade replicativa, inflamação promovida pelo tumor, ativação dos mecanismos de invasão e metástase, indução da angiogênese, instabilidade genômica e mutação, resistência a morte celular e desregulação energética celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Buscando compreender o mecanismo de desenvolvimento de metástase para auxiliar na conduta terapêutica das pacientes, foram sugeridos alguns modelos principais da patogênese do tumor. No primeiro modelo, proposto por Halsted (1907), o câncer de mama é uma doença inicialmente localizada, que na sua progressão se espalha para os linfonodos e a seguir se dissemina por via hematogênica. O segundo modelo, proposto inicialmente por Shapiro e Fugmann (1957), pressupõe que o câncer de mama é predominantemente uma doença sistêmica já no início da carcinogênese. As células tumorais ainda em estágios iniciais seriam capazes de cair na corrente sanguínea, sendo algumas destruídas pelas células do sistema imune, mas uma pequena parte se estabeleceria como micrometástases em sítios distantes. Este modelo tem sido o utilizado como a base para a aplicação de terapias sistêmicas, que visam eliminar as micrometástases (revisado em Comen et al., 2011). Diferentemente destes modelos em que a progressão da doença ocorre exclusivamente de uma maneira unidirecional, foi sugerido por Kim et al. (2009) um modelo de progressão multidirecional, validado experimentalmente em tumores de mama de camundongos. Neste modelo, as células

tumorais podem seguir diferentes caminhos após atingir a circulação: voltar ao tumor de origem, atingir um segundo órgão ou ainda, após atingir este órgão, retornar ao tumor de origem. Por esse modelo poderia ser explicada a associação do tamanho tumoral, do processo de anaplasia nos tumores e da hipervascularização associados a um pior prognóstico, e também o desenvolvimento de recorrência local (Kim et al., 2009).

Inúmeros estudos de análise de expressão gênica em larga escala em carcinomas mamários (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; van't Veer et al., 2002; Sotiriou et al., 2006) vêm sendo realizados com o objetivo de compreender melhor a complexa interação de genes e vias envolvidas em sua progressão (revisado em Reis-Filho & Pusztai, 2011). Dentre os objetivos destes estudos está a identificação de marcadores tumorais que possam auxiliar na detecção precoce do câncer, nos tumores com potencial mais agressivo, no monitoramento da progressão da doença e na determinação da resposta à terapia.

Marcadores tumorais

Os poucos marcadores utilizados na prática clínica, embora contribuam na conduta clínica das pacientes, não são capazes de prever corretamente a evolução da doença como a sobrevida total ou livre da doença na ausência de tratamento (fatores prognósticos) ou a resposta à terapia (fatores preditivos).

Os principais marcadores prognósticos utilizados atualmente incluem: tamanho do tumor, presença de metástase nos linfonodos e o grau histológico. Entre os principais marcadores preditivos estão: o receptor de estrógeno (ER) e o receptor de progesterona (PR), os quais, quando positivos, podem prever uma melhor resposta da paciente ao tratamento com hormonioterapia; e o receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidermal (HER2), igualmente ao receptores ER e PR, podendo prever uma melhor resposta ao tratamento com o anticorpo monoclonal trastuzumabe (revisado em Reis-Filho & Pusztai, 2011).

O *status* dos linfonodos axilares bem como o tamanho do tumor, ou seja, estadiamento da doença, tem sido considerados como os marcadores prognóstico informativos (Espinosa et al., 2011). Contudo, este não é um indicador totalmente preciso, pois aproximadamente 25% das pacientes linfonodo-negativas possuem micrometástases e desenvolvem recorrência, e cerca de 50% das pacientes linfonodo-positivas não

apresentam recorrência mesmo sem tratamento adjuvante e após vários anos de seguimento (Duffy, 2005). Além disso, relatos mais recentes mostram a complexidade associada ao processo metastático do carcinoma de mama. Alguns tumores de tamanhos pequenos podem apresentar metástase em linfonodos e pior prognóstico, sugerindo que pode haver um potencial metastático logo no início da formação do tumor, e por este motivo, apresentam um comportamento altamente agressivo e maior risco de disseminação da doença (Comen et al., 2011; Wo et al., 2011).

A proliferação estimulada pelo estrógeno, tanto das células tumorais quanto das normais, depende da expressão da proteína ER. A detecção da expressão protéica por imunoistoquímica (IHQ) dos receptores hormonais esteroidais ER e PR é usada na rotina clínica como fatores prognósticos e preditivos, definindo a resposta ao tratamento do câncer de mama com hormonioterapia (HT). Pacientes com no mínimo 1% de expressão da proteína ER (IHQ) apresentam melhora na sobrevida livre de doença com o uso dos HT, sendo que a sobrevida é maior em casos com níveis de expressão mais elevados (Harvey et al., 1999).

A amplificação do gene *HER-2* com consequente aumento de expressão destes receptores na superfície da célula tumoral ocorre em aproximadamente 20% dos carcinomas mamários e está relacionada à pior prognóstico (Rakha & Ellis, 2009). A expressão aumentada de *HER-2* é também um fator preditivo ao tratamento com o anticorpo monoclonal humanizado trastuzumabe, que se liga à porção extracelular da proteína *HER-2* e impede a transdução de sinal, aumentando a sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes tanto na doença metastática quanto na localizada (Benson et al., 2009). A indicação terapêutica é feita para pacientes com aumento da expressão protéica de *HER-2* detectada por IHQ ou pela identificação da amplificação gênica (detectada pela metodologia de FISH – Hibridação *in situ* por Fluorescência, ou CISH - Hibridação *in situ* Cromogênica) (Rosa et al., 2009).

Em um recente estudo, nosso grupo demonstrou que os carcinomas de mama *HER-2* negativos apresentaram uma associação entre os níveis reduzidos *TGF-BRII* e um pior prognóstico nestas pacientes (Paiva et al., 2010). Foi verificada a expressão diminuída dos transcritos *TGF-B1* e *TGF-BRII* em CM. A análise proteica em uma grande série de casos revelou que *TGF-B1* e *TGF-BRII* negativos estavam associados ao desenvolvimento de metástases a distância ($P = 0.003$ e $P = 0.029$, respectivamente). A análise multivariada revelou que tumores *TGF-B1*-positivos estavam associados ao

aumento da sobrevida livre da doença [hazard ratio (HR) = 0.489, P = 0.003]. A positividade de TGF-BRII revelou ser um marcador prognóstico independente para a sobrevida livre da doença (HR = 0.439, P = 0.001) e sobrevida global (HR = 0.409, P = 0.003) em casos HER2 negativos. A ausência das proteínas TGF-B1 e TGF-BRII estava significativamente associada ao desenvolvimento de metástases. Assim, novos marcadores moleculares prognósticos tem sido propostos em cânceres de mama, como a análise do TGFBR2 em casos HER-2 negativos.

Os tumores ER, PR e HER-2 negativos, conhecidos como triplo-negativos, apresentam comportamento agressivo e pior prognóstico. Como estas pacientes não são beneficiadas pelas terapias existentes são indicadas ao tratamento quimioterápico sistêmico (Rakha & Ellis, 2009; Morrow & Hortobagyi, 2009).

Perou et al. (2000) e Sorlie et al. (2001; 2003), demonstraram que os carcinomas mamários poderiam ser classificados em subtipos específicos baseados na similaridade ou diferença de seus perfis de expressão. Os autores realizaram uma análise de clusterização hierárquica e classificaram os tumores em quatro grupos principais: os tumores do subtipo luminal, que apresentam expressão elevada do receptor de estrógeno e mostram perfis de expressão similares às células luminais da glândula mamária normal; os tumores do subtipo basalóide, que têm expressão negativa dos receptores hormonais e expressam genes geralmente detectados em células do epitélio basal/mioepitelial; os tumores HER-2, que apresentam expressão elevada deste gene com concomitante amplificação gênica; e os tecidos denominados de “normal-like”, que durante a análise de clusterização ficaram agrupados com amostras de fibroadenoma e mama normal. A sobrevida das pacientes com tumores que apresentam uma alta expressão de genes regulados pelo estrógeno foi significativamente maior em relação as pacientes com tumores que expressavam baixos níveis de genes regulados pelo estrógeno ou que expressam o gene *HER-2* (Sorlie et al., 2001). Estes autores expandiram a série de tumores avaliados e mostraram que o subtipo luminal poderia ainda ser subdividido em três grupos: luminal A, B e C. Tem sido observado que os tumores do tipo basalóide apresentam as mais elevadas taxas de proliferação e uma pior evolução clínica (Sorlie et al., 2001, 2003). Os tumores do tipo luminal, A e B, podem ainda ser discriminados pelo índice de proliferação Ki67 baixo ou alto, respectivamente (Thompson et al., 2011).

O tumor *basal-like* é um subtipo particularmente agressivo definido molecularmente por um conjunto de genes expressos pelas células epiteliais da camada basal ou externa da glândula mamária adulta. Estes tumores são prevalentes em mulheres jovens e muitas vezes apresentam recorrência rapidamente. A maioria dos tumores *basal-like* é negativa para os receptores ER, PR e HER2, também denominados triplo-negativos, e por isso as opções terapêuticas para as portadoras deste subtipo de tumor são limitadas. Embora os termos *basal-like* e triplo-negativos sejam frequentemente usados como sinônimos, há diferença entre eles. O termo *basal-like* é definido pela expressão gênica de tumores que são na maioria ER, PR e HER-2 negativos e positivos para as citoqueratinas 5/6 (CK5 e CK6) e para o receptor do fator de crescimento epitelial EGFR. Além disso, os tumores triplo-negativos são histologicamente heterogêneos, podendo incluir os carcinomas ductais invasivos (*basal-like* e cânceres *não-basal-like*) e outros subtipos, como medular, escamoso, e apócrino (para revisão, Carey et al., 2010)

Os subtipos *basal-like* e *HER-2* têm sido relacionados com a diminuição da sobrevida em pacientes tratados com cirurgia e radioterapia (Perou et al., 2000; Chin et al., 2006). Entre os cânceres de mama esporádicos, o fenótipo *basal-like* corresponde a 10 a 20% dos tumores invasivos, ao passo que entre os tumores hereditários com mutação no gene *BRCA1*, este subtipo representa aproximadamente 90% dos casos (Joosse et al., 2011).

Recentemente, foi identificado um diferente subtipo de CM denominado "*Claudin-low*", que tem como característica a expressão diminuída ou ausente de genes de adesão celular, como por exemplo, *Claudinas 3, 4 e 7* e *E-caderina* (Perou, 2010). Marcadores de superfície celular de células luminais diferenciadas, como EpCAM e MUC1 também possuem baixa ou nenhuma expressão nesse subtipo tumoral. Os tumores *Claudin-low* têm características de células-tronco mamárias (CD44+/CD24-/baixa e ALDH1A1+), aumento de expressão de marcadores característicos da transição epitélio-mesênquima (TEM) e de genes de resposta imunológica. Clinicamente a maioria dos tumores *Claudin-low* é do tipo ductal invasivo triplo-negativo (ER-, PR- e HER2-). Dados preliminares indicam que estes tumores apresentam uma taxa de resposta intermediária à terapia neoadjuvante em comparação com os tumores luminais ou *basal-like* (Prat et al., 2010).

Sendo assim, os estudos moleculares em tumores de mama esporádicos, realizados há mais de 20 anos, tem confirmado o caráter heterogêneo do CM no que se

refere às alterações moleculares, composição celular e resultados clínicos (Joosse et al., 2011). Muitas vezes esta grande heterogeneidade é constatada mesmo entre os pacientes com características clínicas e patológicas semelhantes (Wang et al., 2011). Portanto, o diagnóstico precoce e o tratamento individualizado das pacientes com CM é ainda um desafio a ser vencido.

Em resumo, o ER e o HER-2 se tornaram os protótipos de marcadores preditivos na oncologia clínica, sendo capazes de modificar a conduta terapêutica, porém incapazes de prever a evolução da totalidade das pacientes, identificando quais pacientes desenvolverão metástases e quais possuem um baixo risco de evolução da doença. Desse modo, atualmente a maioria das pacientes é rotineiramente tratada com quimioterapia adjuvante ou terapia hormonal para reduzir o risco de metástases à distância. O tratamento adjuvante, tanto com o uso de quimioterápicos anti-neoplásicos quanto com hormonioterápicos, acarreta um risco de complicações agudas, sub-agudas e crônicas, que apesar de pequeno, não pode ser desprezado (Shapiro & Recht, 2001; Morrow & Hortobagyi, 2009). Neste sentido, a busca de outros marcadores tumorais, tanto prognósticos quanto preditivos, é necessária, de maneira que se possa prever a evolução clínica de um número maior de pacientes e evitar tratamentos desnecessários.

Assinaturas genéticas no câncer de mama.

O uso de metodologias baseadas em *microarrays* permite a identificação de assinaturas genéticas do câncer de mama, definidas como um grupo de genes que pode auxiliar na discriminação de subtipos tumorais, e estas, além de serem capazes de aperfeiçoar os marcadores prognósticos e preditivos utilizados atualmente na rotina clínica, possuem resultados mais reprodutíveis e confiáveis (revisado em Paik, 2011).

Considerando a complexidade e a heterogeneidade clínica do câncer de mama, parece inevitável que marcadores moleculares únicos sejam substituídos pelas assinaturas de perfis genéticos. Até o presente, cinco testes prognósticos têm sido utilizados para aplicação clínica nos EUA: MammaPrint, Veridex 76-gene, MapQuant DX, Oncotype DX e Breast Cancer Index (HoxB13:IL17BR/MGI). O único teste prognóstico com aprovação do FDA (*US Food and Drug Administration*) atualmente é o MammaPrint (revisado em Reis-Filho & Pusztai, 2011).

O teste MammaPrint, também conhecido como perfil de Amsterdam é composto por 70 genes e foi descrito por van't Veer et al. (2002). Neste estudo foram identificados

70 genes de um total de 25000 avaliados por *microarrays* de expressão, os quais diferenciavam tumores classificados como de bom prognóstico daqueles com pior prognóstico numa análise de 78 pacientes com câncer esporádico com idades <55 anos, com linfonodos negativos, 34 destas pacientes apresentavam metástase e 44 apresentavam bom prognóstico durante o acompanhamento de 5 anos. Esta assinatura foi posteriormente validada por outros estudos, como Van de Vijver et al. (2002) em 295 amostras de carcinomas mamários; Buyse et al. (2006) com 307 amostras de carcinomas mamários de pacientes sem metástase em linfonodo; Mook et al. (2009), com 292 amostras de pacientes com metástase em linfonodo; entre outros. Estes relatos confirmaram o poder de predição da evolução clínica das pacientes utilizando esta assinatura.

A assinatura de 76 genes (Veridex 76-gene) foi desenvolvida por Wang et al. (2005) em 115 amostras de carcinomas mamários, na qual foram analisadas separadamente as de acordo com a expressão do receptor de estrógeno (ER). Nas pacientes ER positivas foi possível a identificação de 60 genes com capacidade de predição do desenvolvimento de metástase dentro de 5 anos, e 16 genes com a mesma capacidade nas pacientes que eram ER- negativas. Neste mesmo estudo de Wang et al. (2005), esta assinatura foi posteriormente aplicada em 171 amostras de pacientes que não apresentavam metástase em linfonodos, confirmando seu forte poder de predição para o desenvolvimento de metástase (revisado em Reis-Filho & Pusztai, 2011). Foekens et al. (2006) e Desmedt et al. (2007) validaram estes achados em 180 e 198 amostras, respectivamente, em casos que não apresentavam comprometimento linfonodal.

A assinatura dos 97 genes (comercializada como MapQuant DX), desenvolvida por Sotiriou et al. (2006) em amostras de tecido a fresco congeladas de carcinomas mamários, foi capaz de, além de diferenciar os tumores de grau histológico 1 e 3, categorizar os tumores de grau histológico 2 em alto ou baixo risco de recorrência, auxiliando os oncologistas na melhor conduta clínica das pacientes.

O teste Oncotype DX foi desenvolvido por Paik et al. (2004) e envolveu múltiplos passos de análise para ao final definir uma lista de 16 genes (incluindo os genes *ER*, *PR*, *HER2* e *KI67*) e cinco controles endógenos para avaliação por RT-qPCR. O estudo foi baseado em uma análise de 668 amostras tumorais de pacientes linfonodo-negativas, ER-positivas e tratadas com tamoxifeno. Os níveis de expressão destes genes foram então avaliados por um algoritmo que definiu um escore para cada tumor em baixo,

intermediário e alto risco de metástase à distância. Estes escores se associaram significativamente com sobrevida livre de doença e sobrevida global. Em um estudo realizado por Baehner et al. (2010) com 568 amostras de carcinomas mamários de pacientes sem acometimento linfonodal e sem tratamento com quimioterapia, foi observada uma concordância de 97% para as análises de expressão do *HER-2* entre a utilização da técnica de FISH e a de RT-qPCR (teste Oncotype DX). Contrariamente, Dabbs et al. (2011) em 843 amostras de tumores de mama provenientes de três hospitais, demonstraram que a taxa de resultados falso-negativos para a expressão do *HER2* utilizando o teste Oncotype ultrapassava 50%, questionando o uso exclusivo deste teste para auxiliar os oncologistas a definir a melhor conduta terapêutica para as pacientes.

O quinto teste refere-se a predição de resposta ao tamoxifeno, chamado Theros ou H/I (razão da expressão de *HOXB13:IL17BR* ou índice de grau molecular). Este ensaio foi desenvolvido inicialmente avaliando 60 casos demonstrando que a razão H/I (detectada por RT-qPCR) era capaz de predizer o risco de metástase nas pacientes tratadas com tamoxifeno (Ma et al., 2004).

Outras assinaturas com propostas de aplicação prognóstica têm sido relatadas, como: de células-tronco (Liu et al., 2007; Shipitsin et al., 2007), de fibroblastos (Chang et al., 2004; West et al., 2005), de hipóxia (Chi et al., 2006; Winter et al., 2007; Hu et al., 2008; Lancashire et al., 2010) e de supressores tumorais (Miller et al., 2005; Troester et al., 2006; Saal et al., 2007; Takahasi et al., 2008), entre outras (revisado em Weigelt et al., 2010).

Embora estes testes prognósticos estejam propiciando informações importantes quanto ao risco de recorrência e morte, o valor destes genes como marcadores preditivos estão sob investigação, e, portanto, ainda não está bem estabelecido (revisado em Espinosa et al., 2011; Paik, 2011).

Além disso, antes dos perfis de expressão serem utilizados na prática clínica, várias questões precisam ser resolvidas. A análise de *microarrays* de expressão para classificar os cânceres de mama quanto a predição de resposta clínica e resposta à terapia sistêmica é uma ferramenta relativamente nova e por isso ainda precisa ser mais bem investigada. Os dados atuais em análises de expressão gênica demonstram o poder de estratificação das pacientes, mas ainda os subgrupos são extremamente heterogêneos. Portanto, há a necessidade de delineamento de estratégias de

investigação que subdividam as pacientes em subgrupos mais homogêneos com relação a características clínicas. Em adição, considerando os principais fatores de risco como dieta, estilo de vida e características genéticas populacionais, a análise de perfis de expressão em pacientes brasileiras estratificadas utilizando parâmetros clínicos e histopatológicos homogêneos pode contribuir para o reconhecimento de biomarcadores que associe características biológicas intrínsecas com protocolos terapêuticos. Nas pacientes que necessitam de tratamento sistêmico, novos alvos terapêuticos devem ser desenvolvidos baseados nos padrões de expressão que individualizarão a terapia tumor-específica e potencialmente menos tóxica.

Assinatura genética de metástase em câncer de mama de pacientes brasileiras

Em um estudo anterior do nosso grupo (CNPq, processo nº: 401196/2005-6, processo FAPESP nº: 2007/52632-0) foi avaliada a assinatura genética de tumores de mama de pacientes brasileiras com critérios bem definidos quanto aos marcadores prognósticos e preditivos utilizados na prática clínica (status de ER, PR, HER-2, expressão do gene marcador de proliferação celular Ki-67 e evidência de metástase). Uma das estratégias do estudo envolveu a comparação dos perfis de expressão gênica dos carcinomas ductais invasivos de pacientes que apresentavam características de bom prognóstico (n=15) que não mostraram recidiva clínica durante o seguimento mínimo 7 anos, e de pacientes que desenvolveram metástase independente dos marcadores prognósticos (n=9). Para isso foi utilizada a plataforma de oligoarrays (Human Genome CodeLink bioarrays) contendo 57000 transcritos e ESTs (*Expressed Sequence Tags*), incluindo 45000 genes humanos bem caracterizados.

Após análises de bioinformática, foram identificados 200 genes que separaram corretamente as pacientes de bom prognóstico daquelas que desenvolveram metástase independente dos marcadores prognósticos (Figura 1A). Estes 200 genes foram avaliados em redes biológicas e se mostraram relacionados com a regulação do ciclo celular, regulação da atividade de proteína-quinase, regulação da transcrição, replicação do DNA, “checkpoints” da integridade do DNA, manutenção da estrutura da cromatina, regulação da proliferação celular e adesão celular.

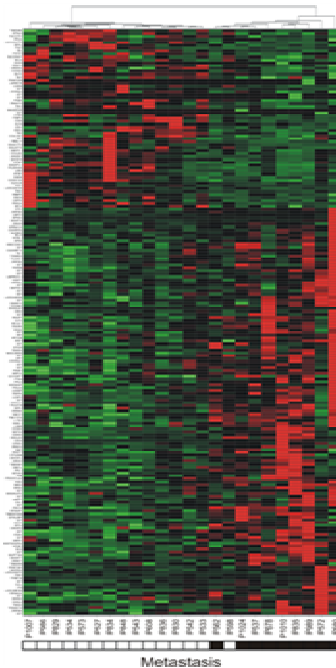
O gene *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), também detectado como diferencialmente expresso e relevante na análise de redes biológicas foi avaliado para

expressão protéica por IHQ (imunoistoquímica) em tumores mamários de um grupo independente de pacientes com seguimento clínico em longo prazo. Uma análise preliminar indicou que a ausência de expressão da proteína ATM estava associada a diminuição da sobrevida livre de doença e da sobrevida global. Adicionalmente, as análises de sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes estratificadas de acordo com o status de ATM mostraram que no subgrupo de pacientes ATM-positivas, a radioterapia teve um efeito protetor e aumentou o tempo de sobrevida livre de doença e de sobrevida global, porém no subgrupo ATM-negativo as terapias adjuvantes (quimioterapia e HT) não mostraram efeito nas sobrevidas. Estes dados sugeriram que o ATM era marcador prognóstico e potencialmente preditivo em pacientes com carcinomas mamários.

Análises de bioinformática robustas realizadas a partir da lista de 200 genes diferencialmente expressos revelaram 58 genes, que mostraram maior poder de discriminação entre os grupos avaliados (Figura 1B). Para investigar se havia interação destes genes entre si ou entre vias metabólicas específicas foi realizada análise de redes biológicas pelos softwares Biocarta, Patika web, T1Dbase e Pathway commons (Figura 2). Dentre os genes centrais das vias, foi identificado um subgrupo de genes com alta conectividade entre eles: *BAD*, *SUPT16H*, *PPM1D*, *TNKS2*, *PAXIP1*, *PHB*, *IKBKB*, *POLR1B*, *TRIP10*, *PGM5*, *EIF3S1* e *CDC6*.

Alguns genes desta lista já foram avaliados por RT-qPCR e validaram a assinatura genética de metástase obtida no estudo prévio. Porém, a continuidade deste estudo para validar os outros genes candidatos bem como avaliar os mecanismos envolvidos na desregulação destes genes é necessária para agregar conhecimento na carcinogênese mamária, e em última instância, traduzir este conhecimento para a prática clínica.

A. 200 genes



B. 58 genes

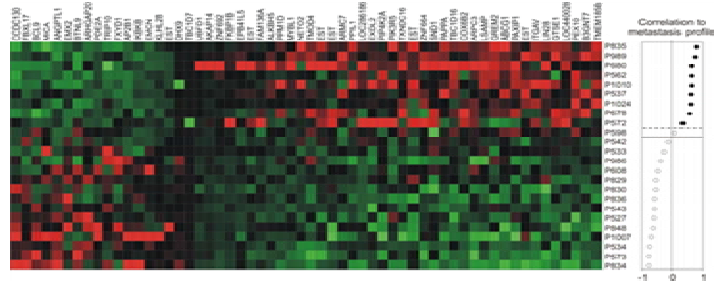


Figura 1. Assinaturas de expressão gênica associada a metástase. **A.** Clusterização hierárquica de 200 genes diferencialmente expressos entre amostras tumorais de pacientes com metástase ($n=9$, círculos cheios) e pacientes sem recorrência clínica no período de 7 anos de seguimento clínico ($n=15$). **B.** Cinquenta e oito genes e transcritos parciais diferencialmente expressos entre tumorais de pacientes com metástase (círculos cheios) e pacientes sem recorrência clínica (círculos vazios) identificados pela análise leave-one-out.

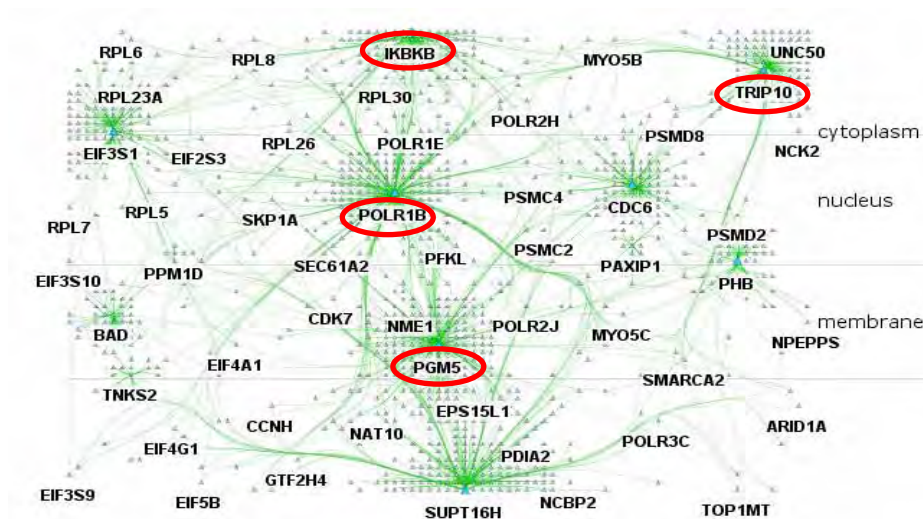


Figura 2. Análise de redes biológicas mostrando alguns dos genes com resultados significantes na análise preliminar dos 200 genes que divergiam entre as pacientes consideradas de bom prognóstico e as pacientes que desenvolveram de metástase.

Genes candidatos detectados na assinatura de metástase

Cinco genes em particular que se mostraram relevantes na assinatura de metástases foram selecionados para o presente estudo, sendo eles: os genes *IKBKB*, *TRIP10*, *POLR1B*, *PGM5* e *ATM*.

O gene *IKBKB* (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*) (*aliases: IKK2, IKKB, NFKB1KB, FLJ40509, IKK-beta, MGC131801*) está mapeado em 8p11.2 e codifica uma proteína participante do complexo IKK, que é composto por IKK α , IKK β , IKK γ e IKAP. A proteína IKBKB participa da via de ativação do fator de transcrição NF- κ B (Nuclear factor- κ B), associado com a resposta inflamatória e com a carcinogênese (Inoue et al., 2007). Na maioria das células, os dímeros de NF- κ B são sequestrados no citoplasma pelas proteínas I κ B. Existem duas vias de ativação de NF- κ B, via clássica e alternativa. Na via clássica, a fosforilação do I κ B nos resíduos de serina pelo I κ B β libera o NF- κ B do I κ B, marcando o I κ B para degradação via ubiquitinação e ativando e liberando o NF- κ B para translocar para o núcleo e ativar os genes alvo. A via alternativa é dependente de IKK α , porém independente de I κ B β e IKK γ (Inoue et al., 2007). Além disso, a fosforilação do IKK β é essencial para a ativação do IKK pelo TNF- α e IL-1. Devido à sua importância na regulação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, fatores angiogênicos, proteínas antiapoptóticas, moléculas de adesão celular e enzimas, as quinases IKK e outras quinases relacionadas a esta agem supostamente como oncogênicas. Como exemplo, o IKBKB age como uma oncoproteína em tumores de mama por promover a degradação do Box Forkhead O3a (FOXO3a), o qual é um fator transcricional que age tanto na inibição do ciclo celular quanto na promoção da apoptose celular (Hu et al., 2004; Lee & Hung, 2008). Segundo Jiang et al. (2010), em uma análise realizada com pacientes portadores de carcinoma hepatocelular, a expressão gênica de *IKBKB* se mostrou significativamente maior no tecido tumoral do que quando comparado ao tecido adjacente correspondente. Os autores também mostraram em modelo *in vitro* que a diminuição de expressão de *IKKA* e *IKKB* aumentava a expressão de outros genes associados com metástase dos carcinomas hepatocelulares. Em câncer de mama já foi relatado aumento de NF- κ B ativado e foi sugerido que este aumento está associado com o aumento da proliferação das células tumorais e resistência à apoptose (Biswas et al., 2004). Evidências também apontam para um possível papel do NF- κ B no processo de metástase dos carcinomas mamários (Cicek et al., 2005). Em um estudo realizado por Chin et al. (2006) em 101 amostras de

tumores de mama, este gene fazia parte dos 66 genes descritos como desregulados devido ao alto nível de ampliações encontradas, podendo ser um potencial alvo terapêutico.

O gene *TRIP10* (*thyroid hormone receptor interactor 10*) (alias: *CIP4*, *HSTP*, *STOT*, *STP*) está mapeado em 19p13.3. Os receptores de hormônio da tireóide (TRs) são fatores de transcrição hormônio-dependentes que regulam a expressão de uma variedade de genes alvos específicos. Este gene foi descrito como responsável pela regulação da polimerização da actina e a reorganização do citoesqueleto celular (Yuan et al., 2001; Tsuji et al., 2006). Em células de carcinoma renal Tsuji et al. (2006) identificaram uma variante deste gene que se apresenta altamente expressa, sendo responsável pela diminuição da adesão entre célula-célula e, com isso, favorece o aparecimento de metástases. Há relato de um possível papel da proteína TRIP10 na resposta à danos ao DNA, mediando as vias de sobrevivência/apoptose em experimentos *in vitro* com linhagens tumorais de mama (Yuan et al., 2001). Em um estudo recentemente realizado por Hsu et al. (2011) em células de adenocarcinoma mamário MCF7, este gene se encontrou não metilado nos tumores ER-positivos e hipermetilado nos tumores de mama que eram ER-negativos, sugerindo portanto que a hipermetilação deste gene promoveria a tumorigênese. Em linhagens celulares de tumores mamários invasivos, o aumento dos níveis de expressão gênica e proteica foi descrito como associado ao processo de invasão (Pichot et al., 2010).

O gene *POLR1B* (*polymerase RNA I polypeptide B*) mapeado em 2q13, codifica uma proteína responsável pela transcrição de genes de RNA ribossomais (rRNA), o principal componente dos ribossomos. A enzima multi-subunitária Pol I é composta de 6 a 14 polipeptídeos, dependendo da espécie. A maioria da massa do complexo Pol I deriva de duas subunidades maiores, Rpa1 e Rpa2 em fungos. O gene *POLR1B* é homólogo ao Rpa2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Em um estudo sobre o processo de diferenciação de granulócitos foi descrita uma forte correlação entre este gene e o *MYC*, onde a reativação do *MYC* em células diferenciadas (onde a expressão se encontra reduzida) levava a um aumento na expressão do *POLR1B* (Poortinga et al., 2011).

O gene *PGM5* (*Phosphoglucomutase 5*) está mapeado em 9q13. As fosfoglucomutases, assim como PGM5, são fosfotransferases envolvidas na conversão de glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato. A atividade de PGM é considerada essencial na formação de carboidratos de glicose-6-fosfato e na formação de glicose-6-fosfato de

galactose e glicogênio. Este gene foi também descrito com função de componente de aderência célula-célula e junções célula-matriz em cultura de células de músculo liso visceral e vascular (Moiseeva et al., 1996; Moiseeva & Critchley, 1997).

A proteína ATM é ativada em resposta à radiação ionizante e desencadeia a fosforilação de CHEK2 e outras proteínas que promovem a parada do ciclo celular e ativação do reparo aos danos do DNA. Mutações no *ATM* estão associadas a doença autossômica recessiva rara conhecida como Ataxia Telangiectasia (AT), caracterizada por ataxia cerebelar, telangiectasias oculares, deficiência imunológica, hipersensibilidade à radiação ionizante e predisposição ao câncer. Pacientes com AT apresentam excessiva apoptose, porém a contribuição do ATM na inibição da apoptose não é totalmente compreendida. A proteína ATM pode ativar NF- κ B por meio da fosforilação do inibidor I κ B, e conseqüentemente ativar a transcrição de genes anti-apoptóticos (Prokopcova et al., 2007).

Já foram descritas mais de 400 mutações no gene *ATM* causadoras da doença, sendo que cerca de 70% delas resultam em terminação prematura da tradução gerando proteínas truncadas. Mutações no *ATM* foram associadas ao risco de desenvolvimento de câncer de mama em famílias (Renwick et al., 2006), no entanto, em cânceres esporádicos essa associação é controversa (Einarsdóttir et al., 2006; Prokopcova et al., 2007; Dombernowsky et al., 2008; Bogdanova et al., 2009).

Há relatos da diminuição de expressão do transcrito e da proteína ATM em tumores de mama (Vo et al., 2004; Ye et al., 2007; Tommiska et al., 2008). Porém, os mecanismos envolvidos na diminuição da sua expressão não estão estabelecidos. Há relatos da presença de hipermetilação das ilhas de CpG na região promotora do gene levando ao seu silenciamento, no entanto, os estudos mostram resultados contraditórios. Em um estudo de Vo et al. (2004), foi observada hipermetilação em 78% das amostras de tumores de mama avançados (18 das 33 casos). Estudos mais recentes, porém, não mostraram associação entre o *status* de metilação do gene *ATM* com os tumores de mama (Brandes et al., 2007; Treilleux et al., 2007; Pal et al., 2010).

Outro mecanismo sugerido para o silenciamento do gene *ATM* é a perda de um alelo detectado por estudos de perda de heterozigose (*Loss of Heterozygosity* - LOH). A perda de um alelo do *ATM* já foi relatada em 40% dos tumores de mama (Rio et al., 1998), no entanto, o mecanismo de inativação do outro alelo ainda não é conhecido (Prokopcova et al., 2007).

Diferentes mecanismos de regulação gênica foram avaliados em neoplasias humanas. Um dos mecanismos de regulação pós-transcricional é realizado por pequenas moléculas de RNA, denominadas microRNAs (miRNA). Essas moléculas não codificantes possuem de 18 a 25 nucleotídeos e tem revolucionado a compreensão da modulação da expressão gênica (revisado em Di Leva & Croce, 2010). Embora a maioria dos microRNAs se encontre localizada em regiões intergênicas, alguns também são observados nas regiões intrônicas de genes conhecidos e, de acordo com a sua localização, podem ser classificados em: microRNAs exônicos localizados em transcritos não codificadores, microRNAs intrônicos em transcritos não codificadores e microRNAs intrônicos localizados em transcritos codificadores de proteínas (Iorio et al., 2011).

Até o momento, 1527 sequências de miRNA foram identificadas na espécie humana (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, acesso em 20 de dezembro de 2011). A interação de um miRNA com o transcrito de mRNA alvo pode levar a repressão da tradução do mRNA ou a sua degradação (Cowland et al., 2007). Devido a complementaridade parcial entre o miRNA e seu transcrito alvo, um único miRNA é capaz de regular simultaneamente centenas de genes, tendo assim um enorme potencial regulatório (Du & Zamore, 2007). Por controlar a expressão de seus alvos, os miRNAs apresentam um papel importante na regulação da diferenciação celular, proliferação e apoptose (Di Leva & Croce, 2010). Como estes processos são conhecidamente desregulados em câncer, não é surpreendente que muitos estudos tenham associado o papel dos miRNAs com a carcinogênese e ainda explorado como a expressão anômala dessas seqüências influenciaria a tumorigênese (Di Leva & Croce, 2010).

O número de estudos envolvendo alterações em miRNAs em câncer humano vem aumentando exponencialmente e várias sequências já foram associadas com a atividade de supressor de tumor (cluster miR-15a-16-1, cluster miR-143-145 e família let-7) ou de oncogene (miR-155, miR-21 e miR17-92) (revisado em Barbaroto et al., 2008; Iorio & Croce, 2009).

A expressão elevada de um miRNA com função de oncogene pode reduzir os produtos protéicos de genes supressores de tumor. Ao passo que a diminuição de miRNAs com função supressora pode causar o aumento nos níveis protéicos de oncogenes. O resultado final seria o desregulação entre os processos de apoptose e diferenciação celular, aumentando a proliferação e o desenvolvimento de metástase

(Gomes & Gomes, 2008; Hurst et al., 2009).

Utilizando análises globais de *microarray* de expressão foi demonstrada a desregulação significativa da expressão de miRNAs em carcinomas mamários comparados ao tecido de mama normal (Iorio et al., 2005). Dentre os miRNAs diferencialmente expressos, miR-10b, miR-125B, miR-145, miR-21, e miR-155 foram encontrados como mais consistentemente desregulados no câncer de mama. Os miR-10b, miR-125B e miR-145 foram verificados como regulados negativamente e miR-21 e miR-155 como regulados positivamente, sugerindo que eles podem agir potencialmente como genes supressores de tumor ou oncogenes, respectivamente (Iorio et al., 2005). Em outro estudo realizado por Yan et al. (2008), assim como descrito no estudo de Iorio et al. (2005), os microRNAs miR-21 e miR-155 também foram observados como regulados positivamente em tumores de mama, quando comparados a amostras normais e, além destes microRNAs, miR365, miR-181b, let-7f, miR-29b, miR-181d, miR-98 e miR-29c também foram observados como regulados positivamente nestes tumores.

Os mecanismos envolvidos na desregulação dos miRNAs ainda são obscuros. Porém, sabe-se que mais da metade dos miRNA humanos estão localizados em regiões cromossômicas frágeis e que são sensíveis à amplificação, deleção ou translocação durante o desenvolvimento do tumor; conseqüentemente, estas anormalidades genéticas podem levar a alteração da expressão dos miRNAs localizados nessas regiões (Shi & Guo, 2009). Calin et al. (2004) já haviam relatado 15 miRNAs localizados em 10 regiões de sítios frágeis em tumores de mama.

Sendo assim, a hipótese inicial do presente estudo foi de que os miRNAs estariam envolvidos na regulação do gene *ATM*, e que, portanto, a diminuição da expressão da sua proteína poderia ser decorrente da expressão aumentada de miRNAs reguladores do *ATM*. Na ocasião em que este trabalho foi delineado, não havia relatos em literatura sugerindo este mecanismo associado à regulação do gene *ATM* em qualquer modelo tumoral. Para o nosso conhecimento, há atualmente três estudos em literatura associando os microRNAs com a regulação do gene *ATM*. No estudo realizado por Hu et al. (2010) em linhagens celulares de neuroblastoma, foi observado um aumento da expressão do miR-421 associado a diminuição da expressão de *ATM*, permitindo, conseqüentemente, a progressão do tumor. Ng et al. (2010) observaram um aumento na expressão do miR-100 como responsável pela diminuição da expressão do *ATM* em linhagens celulares humanas de glioma. Segundo os autores, estes fatores promoveriam

a sensibilização das células tumorais ao tratamento com radioterapia ou quimioterapia e, portanto, favoreceriam o tratamento. Recentemente, Song et al. (2011) analisaram 10 amostras de carcinomas mamários e 9 linhagens de mama normal e observaram o aumento da expressão do miR-18a, o qual se encontrava correlacionado à diminuição dos níveis de ATM. Os autores associaram este microRNA a um pior prognóstico destas pacientes e poderia ser este um potencial alvo terapêutico.

A descrição da metodologia, resultados e discussão relacionados a investigação do gene *ATM*, sua proteína e candidatos a reguladores (miRNAs) está apresentada na forma de manuscrito. Os métodos utilizados no estudo e os resultados dos demais genes encontram-se a seguir. Dois outros manuscritos encontram-se em fase de preparação.

JUSTIFICATIVA

Apesar da grande variedade de parâmetros clínicos, morfológicos, histológicos e, em menor escala, moleculares que estão disponíveis para classificar os carcinomas de mama, tem se observado que pacientes com o mesmo diagnóstico podem apresentar comportamento clínico e resposta ao tratamento completamente diferentes. Portanto, a busca por marcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico e resposta a tratamento é um campo de intensa investigação. A análise do perfil de expressão gênica global tem um grande potencial para melhorar nosso conhecimento da biologia molecular do câncer de mama bem como permitir a identificação de novos marcadores moleculares. Usando essa metodologia, um estudo anterior comparou tumores mamários de dois grupos de pacientes com evoluções clínicas diferentes e com características clínicas bem definidas. O objetivo era contribuir para a detecção de marcadores que pudessem identificar as pacientes que apresentassem probabilidade de evolução distintas, que estivessem relacionados com a recorrência e progressão da doença e que futuramente pudessem individualizar a terapia de uma maneira tumor-específica e potencialmente menos tóxica. As análises mostraram uma assinatura genética de metástase que separou corretamente as pacientes com metástase daquelas sem recorrência da doença. A análise de alguns genes candidatos validou este achado. Dentre os candidatos avaliados, o gene *ATM* mostrou potencial aplicação como marcador prognóstico e preditivo de resposta a radioterapia. Além disso, o mecanismo envolvido na desregulação deste gene ainda é desconhecido. Assim, a identificação dos mecanismos envolvidos na desregulação do gene *ATM* e a análise de outros genes candidatos identificados nesta assinatura, são fundamentais para nortear futuros estudos no desenvolvimento de testes diagnósticos.

OBJETIVOS

Gerais:

1. Avaliar a expressão de genes *POLR1B*, *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM5* e *ATM* que foram previamente identificados na análise global de expressão gênica em amostras de carcinomas mamários com diferentes evoluções clínicas;
2. Avaliar se a diminuição da expressão do gene *ATM* está associada a desregulação de miRNAs candidatos à regulação deste gene.

Específicos:

- 1a. Associar os dados de expressão com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes.
- 1b. Detectar a expressão da proteína ATM por imunoistoquímica em carcinomas mamários em um grupo maior e independente de pacientes com longo seguimento clínico.
- 1c. Investigar o valor prognóstico da proteína ATM por meio de análises de sobrevida.
- 2a. Avaliar os níveis de expressão dos microRNAs miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664, miR-26a, miR-26b e miR-18a, os quais são candidatos à regulação da transcrição do gene *ATM* por meio da análise da expressão por RT-qPCR em tumores de mama.
- 2b. Associar os achados com dados clínicos e histopatológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e amostras

Para as análises de expressão gênica e de miRNA foram avaliadas 63 amostras de carcinomas ductais invasivos de mama de pacientes que se submeteram a ressecção segmental ou mastectomia, provenientes do Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP. Estas amostras correspondem ao grupo de validação técnica ou ao grupo de validação biológica. O grupo de validação técnica é composto pelas mesmas amostras utilizadas na análise de expressão gênica global e que geraram a assinatura genética de metástase, composta por 20 amostras distribuídas em dois subgrupos de pacientes: grupo 1, com 11 pacientes avaliadas como “bom prognóstico”; e grupo 2, com 9 pacientes que desenvolveram metástase independente do prognóstico inicial. O grupo de validação biológica constituiu-se de amostras tumorais de um grupo independente de pacientes (n=43) subdivididas em dois grupos, grupo de “bom prognóstico” (n=39), e grupo de pacientes com metástase independente do prognóstico (n=4).

Os critérios de inclusão das pacientes para o estudo de expressão gênica global no grupo de bom prognóstico incluíram a presença de cinco parâmetros ou mais: i) estadio clínico do tumor I-IIA, ii) tamanho do tumor menor do que 2 cm, iii) grau histopatológico I ou II, iv) status negativo dos linfonodos axilares ou menos do que quatro linfonodos comprometidos, v) receptor de estrógeno (ER) positivo (escores 2+/3+); se o ER for negativo ou (1+) o receptor de progesterona deve ser positivo (escores 2+/3+), vi) HER-2 negativo ou (1+) por ensaio de imunoistoquímica, vii) baixo potencial proliferativo (<25% das células positivas para a expressão de Ki67) e viii) ausência de metástase à distância após no mínimo 7 anos de seguimento após a cirurgia. Amostras a fresco de sete mamas normais provenientes de pacientes submetidas a cirurgias para redução mamária foram obtidas e utilizadas como controles normais.

As pacientes e controles foram seguidas prospectivamente, sendo que nenhuma delas tinha histórico prévio de câncer. As pacientes foram tratadas com ressecção segmental ou mastectomia, incluindo dissecação dos linfonodos axilares, seguido por radioterapia e terapia sistêmica adjuvante, se indicado. Apenas uma paciente recebeu quimioterapia antes da cirurgia, e neste caso, o material da biópsia foi utilizado para a análise. Todas as pacientes (casos e controles) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Imediatamente após a cirurgia, as amostras de tumor e de mamas normais foram congeladas e armazenadas a -80°C. Os tecidos congelados foram histopatologicamente avaliados e todas as amostras de câncer de mama foram confirmadas como carcinoma ductal invasivo. A classificação histológica foi realizada de acordo com o *WHO International Classification of Disease for Oncology* (1990), e o estadió clínico foi determinado de acordo com o *AJCC TNM Staging System for Breast Cancer* (2010). A malignidade dos carcinomas infiltrativos foi pontuada de acordo com *Scarff-Bloom and Richardson Grading System* (1957).

Para a análise da expressão proteica pelo método de imunoistoquímica foram avaliadas 926 amostras de carcinomas mamários em um grupo independente de casos do Hospital AC Camargo, São Paulo, SP. As pacientes apresentavam um seguimento clínico de $81,9 \pm 35,1$ meses (1-274 meses), organizadas em quatro blocos de parafina em microarranjos de tecidos (do inglês, *tissue microarray*, TMA). Os TMAs foram construídos no Hospital AC Camargo, cuja metodologia para a construção foi descrita previamente (Nagai et al., 2007).

O Comitê de Ética da Fundação Hospital Amaral Carvalho e do Hospital AC Camargo, Fundação Antonio Prudente aprovaram este estudo (CEP FHAC 007/05 e CEP HACC 1155/08, respectivamente). Este projeto também foi aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina, UNESP-Botucatu (CEP FMB 3816-2011).

Metodologia

Macrodissecção e extração de RNA

Nas amostras de tecido a fresco congelado de carcinomas mamários foram feitos cortes de congelamento sequenciais de 5 µm, com a utilização de um criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha). Posteriormente, as lâminas preparadas foram coradas com hematoxilina e eosina, as quais foram analisadas pela patologista Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, a fim de delimitar a região tumoral para realização de macrodissecção. O mesmo procedimento foi realizado para seleção das células epiteliais mamárias dos tecidos normais de mama utilizados como controles. Estas amostras, após a macrodissecção,

foram homogeneizadas utilizando o equipamento Precellys® (BioAmerica Inc, Florida, EUA).

O método utilizado para a extração do RNA foi por *Trizol*® (Invitrogen), de acordo com especificações do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Aproximadamente 1µg de RNA total foi submetido ao tratamento com DNase I.

Análise de Expressão de Transcritos dos Genes Candidatos

Obtenção do cDNA

A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com 1µg de RNA total utilizando a enzima Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para este protocolo foi utilizado 1µl de oligodT (500 µg/mL), 1µl de random primers (100µg/ml) e 1µl de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 4µl de tampão de transcrição 5x, 1µl de DTT 0,1M e, por último, foi adicionado 1µL da enzima Super-script III (200U/µL) em cada tubo e incubado a 25°C por 5 minutos, 50°C por 1 hora e meia, seguido de 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição o cDNA foi mantido a -20°C.

RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Os iniciadores para os diferentes genes alvo (*POLR1B*, *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM* e *ATM*) utilizados nas reações de amplificação foram desenhados usando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 1). Os números de acesso das seqüências de cada gene espotados na lâmina de *oligoarray* foram anotados e a seguir as seqüências foram obtidas no site do Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os iniciadores foram desenhados de modo que pelo menos um estivesse localizado na região de junção entre éxons. Para haver uma maior concordância entre os dados de *microarray* e de RT-qPCR, foram selecionadas regiões para a construção dos iniciadores de modo que houvesse apenas a amplificação das mesmas variantes de *splicing* detectadas pelas sondas incluídas no *microarray*. Os genes de referência testados foram: *HMBS*, *HPRT1*, *ACTB*, *RPLP0*, *GUSB* e *GAPDH* (Tabela 1).

Foi utilizado o método químico de detecção pelo uso do reagente Sybr Green (Applied Biosystems). As reações de RT-qPCR foram padronizadas para cada iniciador.

Foram determinadas as eficiências das reações para cada par de iniciadores utilizando curvas-padrão obtidas a partir de diluições seriadas de um “pool” de cDNA das amostras de pacientes e controles. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços utilizando o reagente *Power SYBR-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e o equipamento utilizado foi o termociclador automático StepOne Plus (Applied Biosystems, Life Technologies). A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C. Curvas de dissociação foram incluídas ao final de cada corrida para a determinação da especificidade dos produtos da PCR. Amostras cujas réplicas mostraram desvio padrão maior que 0,5 entre as quantificações relativas (QR) foram reavaliadas. A média dos valores dos QRs das duplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados na análise de expressão gênica.

Genes	Sequência dos iniciadores	Localização cromossômica
<i>POLR1B</i>	D: 5'-CAGTTTCTTGGCTATGTTCCCATCA-3' R: 5'-CCCCATTTCTCTGCCTCCT-3'	2q13
<i>IKBKB</i>	D: 5'-ATGTCTCAGCCCTCCACGG-3' R: 5'-TCAGCCACCAGTTCTTCACTCT-3'	8p11.2
<i>TRIP10</i>	D: 5'-AGCTTGGAGCCCCAGATCGCT-3' R: 5'-TCTGCCAGCCACGCCTCATACT-3'	19p13.3
<i>PGM5</i>	D: 5'-TCTGATGGACTCAGGACGTTGCA-3' R: 5'-TCTCGGAGGTGGTCAGAGCCAGT-3'	9q13
<i>ATM</i>	D: 5'-TTTAGAAATTCTTTCCAAAAGCCCTG-3' R: 5'-TTATTTGTTTCAGCTGCTTGCTCA-3'	11q22-q23
<i>HMBS*</i>	D: 5'-GGCAATGCGGCTGCAA-3' R: 5'-GGGTACCCACGCGAATCAC-3'	11q23.3
<i>HPRT1*</i>	D: 5'-TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG-3' R: 5'-GGCCTCCCATCTCCTTCATC-3'	Xq26.1
<i>ACTB*</i>	D: 5'-TTCCTGGGCATGGAGTC-3' R: 5'-CAGGTCTTTGCGGATGTC-3'	7p22
<i>RPLP0*</i>	D: 5'- GGAGACGCATTACACCTTC-3' R: 5'- CTTCACCTTAGCTGGGG-3'	12q24.2
<i>GUSB*</i>	D: 5'- GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT-3' R: 5'- CCGAGTGAAGATCCCTTTTTA-3'	7q21.11
<i>GAPDH*</i>	D: 5'- TGCACCACCAACTGCTTAG-3' R: 5'- GATGCAGGGATGATGTTC-3'	12p13

Legenda: * Genes de referência (endógenos); D= iniciador direto; R = iniciador reverso.

Análise de Expressão da Proteína ATM

A expressão da proteína ATM foi detectada pelo método de imunoistoquímica (IHQ) em 926 amostras organizadas em quatro plataformas de microarranjos de tecidos.

As amostras foram seccionadas em cortes de 5µm de espessura e montadas em lâminas de vidro. Estes cortes foram submetidos a tratamento com xilol para a retirada da parafina em três trocas de cinco minutos a temperatura ambiente. A seguir os cortes foram hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e posteriormente lavados em água corrente por 5 min. A recuperação

antigênica foi feita utilizando tampão citrato pH=6,0 em panela de pressão. A seguir realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10V) com três trocas de 5 min cada. As incubações com o anticorpo primário diluído em PBS (tampão salino fosfato) foram feitas por aproximadamente 12 h a 4° C. O anticorpo utilizado foi o anticorpo monoclonal de coelho anti-ATM, Clone Y170 (Epitomics, Burlingame, CA, USA) na diluição de 1:200. Após a incubação com o anticorpo primário, foi utilizado o sistema de detecção por polímeros Novolink polymer (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK). As reações foram realizadas a partir de soluções contendo 0,6 mg/ml de 3.3'-diaminobenzina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma, St Louis, MO) e 0.01% H₂O₂. Estas lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas com lamínula. As reações foram acompanhadas de controles positivos para o anticorpo segundo instruções do fabricante. Além disso, lâminas contendo amostra de mama normal foram incluídas para avaliação da expressão da proteína na mama normal. Dois controles negativos foram incluídos, o primeiro feito pelo não uso do anticorpo primário e o segundo pela incubação com soro de coelho. A leitura das imunocolorações nos TMAs foi realizada pela patologista Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.

Análise de expressão de MicroRNAs (miRNA)

Para a análise de expressão foram selecionados sete miRNAs candidatos à regulação transcricional do gene *ATM*: hsa-miR-421, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-203, hsa-miR-664, hsa-miR-576-5p e hsa-miR-18a (Tabela 2). Para a seleção dos miRNAs candidatos foram consultados seis algoritmos de predição, como detalhado na Tabela 2:

TargetScan (<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>),

Microcosm Targets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm>)

PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar>)

microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)

Diana-microT (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>).

Obtenção do cDNA

As amostras de RNA dos tumores e controles foram extraídas utilizando o método do *Trizol*® (Invitrogen), de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram previamente diluídas em uma concentração de 2ng/μL e a síntese dos cDNAs foi realizada usando o kit *Taqman miRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies), conforme especificações do fabricante. Nesta etapa foram utilizados iniciadores em forma de *loop*, os quais apresentam uma região complementar a sequência de cada miRNA maduro.

Tabela 2. Descrição dos microRNAs selecionados como reguladores putativos do gene *ATM* e utilizadas nas amostras de câncer de mama invasivo por RT-qPCR.

MicroRNAs	Sequência miRNA maduro	Sequência <i>Stem Loop</i>	Website
Microcosm Targets			http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm
1. hsa-miR-421	AUCAACAGACAU UAAUUGGGCGC	GCACAUUGUAGGCCUCAUAAAAUGUUUG UUGAAUGAAAAAUGAAUCAUACACAGA CAUUAUUGGGCGCCUGCUCUGUGAUCUC	
PicTar			http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar
2. hsa-miR-26b	UUCAAGUAAUUC AGGAUAGGU	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGAUA GGUUGUGUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCA UACUUGGCUCGGGGACCGG	
Target Scan			http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan
3. hsa-miR-203	GUGAAAUGUUU AGGACCACUAG	GUGUUGGGGACUCGCGCGCUGGGUCCAGU GGUUCUUAACAGUUCAACAGUUCUGUAG CGCAAUUGUGAAAUGUUUAGGACCACUA GACCCGGCGGGCGCGGCGACAGCGA	
4. hsa-miR-18a	UAAGGUGCAUCU AGUGCAGAUAG	UGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG UGAAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUA GUGCUCUUCUGGCA	
MicroRNA.org			http://www.microrna.org/microrna/home.do
5. hsa-miR-664	UAUUCAUUUAU CCCCAGCCUACA	GAACAUUGAAACUGGCUAGGGAAAAUGA UUGGAUAGAAACUAUUUUAUUCUAUUCU UAUCCCCAGCCUACAAAAUGAAAAA	
6. hsa-miR-576-5p	AUUCUAAUUC UCCACGUCUUU	UACAAUCCAACGAGGAUUCUAAUUCUCC ACGUCUUUGGUAUAAGGUUUGGCAAAG AUGUGGAAAAAUUGGAAUCCUCAUUCGA UUGGUUAUAACCA	
Diana-microT			http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/
7. hsa-miR-26a	UUCAAGUAAUCC AGGAUAGGCU	GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGG CUGUGCAGGUCCAAUGGGCCUAUUCUUG GUUACUUGCACGGGGACGC	

Análise da expressão dos transcritos por RT-qPCR

As PCRs foram realizadas em um termociclador automático StepOne Plus (Applied Biosystems, Life Technologies), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os miRNAs de referência testados foram: RNU48, RNU44, U47, RNU6B, let-7a e miR-16. Todos os iniciadores dos alvos (miR-421, miR-26b, miR-203, miR-664, miR-576-5p, miR-26a e miR-18a), assim como os iniciadores dos microRNAs de referência foram realizados pelo sistema TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems, que utiliza sondas marcadas com fluorescência. Os miRNAs foram amplificados utilizando o *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* (Applied Biosystems – Life Technologies).

Seleção dos genes e dos microRNAs de referência para a normalização de RT-qPCR

Os genes *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* e *RPLP0* foram avaliados como genes de referência para as amostras de carcinomas mamários. A escolha das amostras para esse pré-teste seguiu os mesmos critérios adotados no estudo (amostras normais, de “bom prognóstico” e de pacientes que desenvolveram metástase).

A mesma estratégia foi utilizada para a seleção dos miRNAs de referência. Os miRNAs testados foram: RNU44, RNU48, RNU6B, RNU47, let-7a e miR-16. A seleção dos microRNAs let-7a e miR-16 foi realizada conforme estudo publicado de Davoren et al. (2008), nos quais estes microRNAs apresentavam uma menor variação nos tecidos tumorais. Os demais RNAs foram selecionados seguindo recomendações do fabricante.

A estimativa da estabilidade de expressão dos genes e microRNAs candidatos a referência (pré-teste) e a estabilidade real de expressão do conjunto de genes e microRNAs selecionados entre o total de amostras alvo foi realizada pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Esse algoritmo foi desenvolvido por Vandesompele et al. (2002) para determinar os genes de referência mais estáveis para um determinado grupo de amostras.

Análise dos resultados

Os níveis de expressão gênica dos genes candidatos e dos miRNAs foram correlacionados com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes. Testes não paramétricos ANOVA ou t-Student foram utilizados para avaliar os níveis de transcritos nos diferentes grupos avaliados (amostras tumorais *versus* controles; tumores agrupados de acordo com os dados clínicos e histopatológicos). O teste de Fisher ou Qui-quadrado foi utilizado para avaliar os resultados da expressão proteica em relação aos parâmetros clínicos-histopatológicos nos diferentes grupos. O Teste de Spearman foi aplicado para análises de correlação. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $P < 0,05$. Curvas de sobrevida para os genes avaliados foram construídas pelo método de Kaplan-Meier. Foi realizada a análise multivariada utilizando o modelo de risco proporcional de Cox. Os programas utilizados foram: GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) e SPSS version 17.0 (SPSS;Chicago, IL) para Windows.

RESULTADOS

Serão apresentados os resultados referentes às análises de expressão dos genes candidatos *IKBKB*, *TRIP10*, *POLR1B* e *PGM5*, e as análises dos miRNAs: miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a nas comparações entre tecidos tumorais e normais e em relação às características clínicas e histopatológicas. Os resultados referentes à análise do gene *ATM*, sua expressão proteica e a correlação entre *ATM* e os miRNAs preditos como reguladores estão apresentados na forma de manuscrito em preparação.

Expressão relativa dos genes candidatos: *POLR1B*, *IKBKB*, *TRIP10* e *PGM5*

Escolha de transcritos referência para a normalização de RT-qPCR

Foram selecionados os genes *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* e *RPLP0* como possíveis referências nas amostras de carcinomas mamários. O critério de seleção baseou-se no fato destes genes se mostrarem estáveis em outros tumores avaliados pela equipe e em relatos da literatura.

O pré-teste incluiu parte das amostras tumorais (9 de 63 amostras de carcinomas mamários) que apresentavam maior quantidade de RNA. Foram testados seis genes de referência candidatos a normalizadores, que demonstraram boa estabilidade (M) de expressão para os transcritos testados (exceto para o *RPLP0*), segundo o coeficiente de estabilidade de expressão abaixo do limiar de 1,5 sugerido pelo programa geNorm (Figura 3). O coeficiente de estabilidade de expressão (M) é determinado partindo do princípio de que dois genes referência ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras a serem analisadas, independente de quaisquer condições experimentais ou tipos celulares. O programa geNorm avalia a razão de expressão de cada gene referência em relação aos demais sempre aos pares, o que permite a exclusão dos transcritos menos estáveis (Vandesompele et al., 2002).

Não foi considerada a amostra de menor Ct como referência nessa análise, conforme sugerido por Vandesompele et al. (2002), pois uma linhagem de mama (HB4) foi utilizada como referência, para calibrar os valores de expressão inter-placas. Os valores de expressão desta amostra para cada gene (1,000) foram incluídos na análise pois esta é uma linhagem de célula epitelial de mama normal.

Nesta análise, o gene *HMBS* demonstrou a expressão mais estável (M=1.085) e *RPLP0* menos estável (M=1.922) entre as amostras testadas. Após a remoção em série

dos genes com maior variação entre as amostras, o programa geNorm indicou o uso de *ACTB* + *HPRT* como o melhor par de transcritos, seguidos dos seguintes genes em ordem decrescente de estabilidade: *HMBS*, *GUSB*, *GAPDH* e *RPLP0* (Figura 4).

O conjunto de genes referência apropriado foi também estimado, pelo cálculo do desvio padrão da relação dos fatores de normalização com a adição de um novo transcrito ao grupo prévio. Observou-se o aumento do desvio padrão quando da inclusão de um novo transcrito ao grupo prévio, indicando que a normalização por este conjunto de genes ainda estava adequada (Figura 5).



1.5	ACTB	HPRT	RPLP0	GUSB	GAPDH	HMBS	Normalisation Factor
543	9.17E-02	2.19E-02	3.00E-02	6.10E-02	1.06E-02	5.61E-02	1.0864
562	4.86E-02	2.06E-02	8.33E-02	4.82E-02	8.17E-03	3.96E-02	0.7974
572	1.40E-01	4.45E-02	1.23E-01	1.01E-01	4.11E-02	4.33E-02	1.8732
594	2.73E-01	8.25E-02	7.16E-02	7.43E-02	6.45E-02	7.48E-02	2.7829
609	2.44E-02	5.45E-03	2.36E-03	1.19E-02	1.91E-03	1.65E-02	0.2528
680	2.04E-02	1.04E-02	1.37E-02	3.34E-02	1.75E-03	1.48E-02	0.3278
835	3.80E-02	1.77E-02	1.07E-01	7.46E-02	2.48E-02	4.74E-02	1.0400
827	1.05E-02	6.35E-03	6.60E-04	7.52E-03	3.10E-04	6.75E-03	0.1167
526	8.12E-02	2.90E-02	4.29E-03	2.50E-02	4.22E-03	4.08E-02	0.7310
1283N	5.94E-02	2.32E-02	3.15E-01	4.97E-02	1.62E-02	5.24E-02	1.0372
HB4	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	29.0423
M < 1.5	1.182	1.131	1.922	1.096	1.477	1.085	

Figura 3 - Expressão relativa, fator de normalização e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência testados. *HMBS* apresenta expressão mais estável (verde) individualmente e *RPLP0* é o mais variável (vermelho) nas 9 amostras de carcinomas mamários testadas. O fator de normalização representa a média geométrica da expressão relativa dos seis genes avaliados.

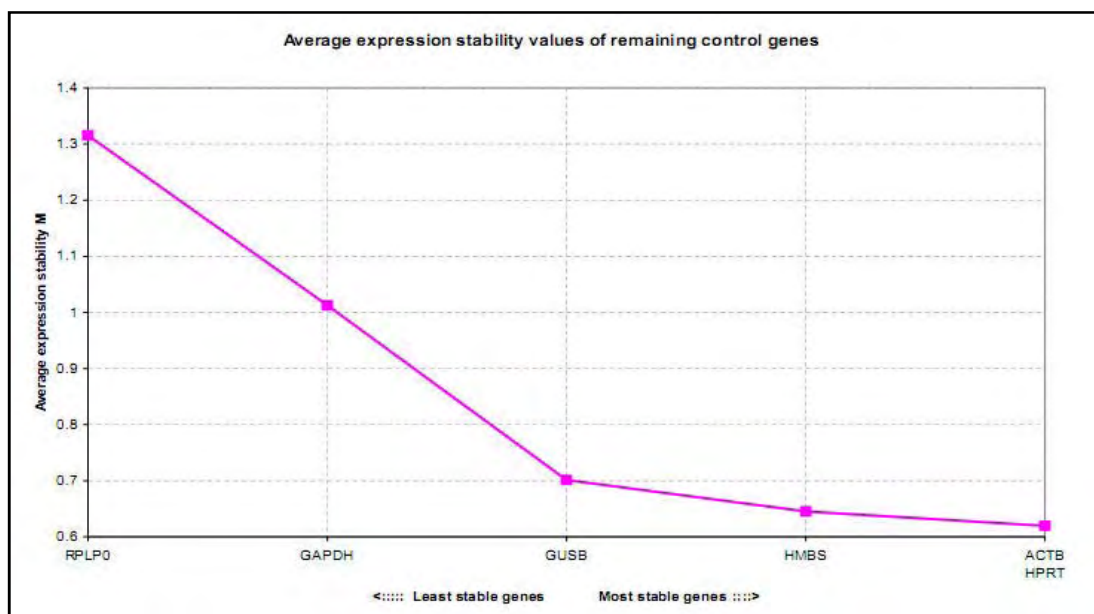


Figura 4 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência. Cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável, indicando *ACTB + HPRT* como os mais estáveis com o mesmo valor de estabilidade.

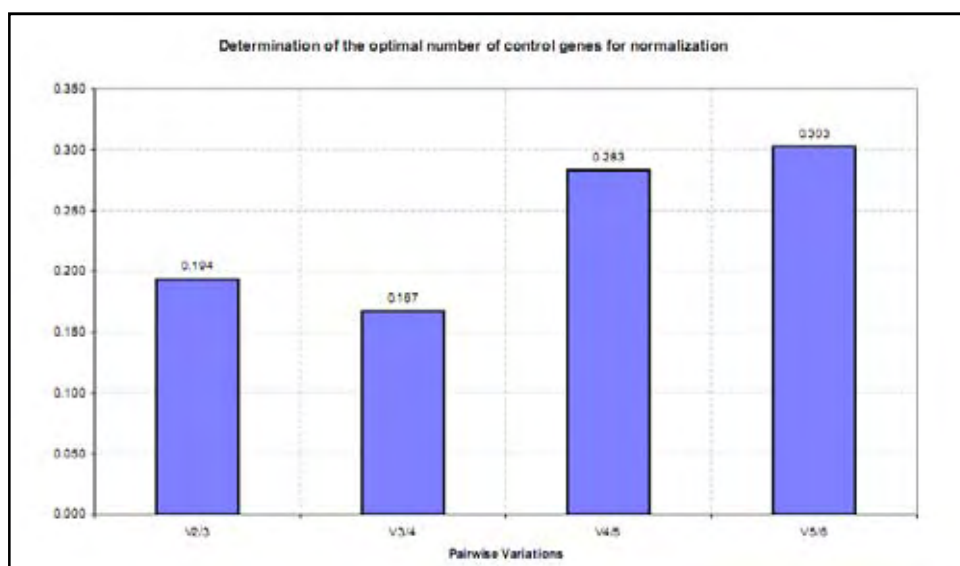


Figura 5 - Determinação do número adequado de genes de referência. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos quatro transcritos (3/4) se obtém a normalização de maior fidelidade (*ACTB + HPRT + HMBS + GUSB*). A análise estima o número de genes de referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação aos fatores de normalização.

Esta análise mostrou que deveriam ser utilizados quatro genes de referência para a normalização da expressão dos genes alvos nos carcinomas mamários. Isso porque o menor desvio entre os fatores de normalização foi obtido na inclusão do quarto transcrito (*GUSB*) ao grupo prévio com os três ($V3/4 = 0.167$). Entretanto, mesmo com tantos genes de referência, não foi possível atingir o ideal (< 0.150) proposto por Vandesompele et al. (2002), no qual a adição de um novo transcrito para a normalização seria redundante.

Sendo assim, considerando a quantidade limitada das amostras de RNA dos tumores e que não houve diferença significativa após a adição do quarto gene de referência (adição do *GUSB* não alterou de forma significativa a relação dos fatores de normalização com apenas os três genes mais estáveis, $V2/3 = 0.194$), optou-se por utilizar três genes de referência: *ACTB*, *HPRT* e *HMBS*. Vale ressaltar que a seleção de três genes de referência permite que a estabilidade de expressão seja validada no total de amostras de carcinomas mamários ao final das análises para a confirmação da estabilidade dos genes de referência (três é o número mínimo de genes para a análise pelo programa geNorm).

Correlação entre valores de expressão relativa dos genes avaliados por microarray e RT-qPCR

Após a seleção dos genes *ACTB*, *HPRT* e *HMBS* como referência para as análises de expressão gênica, todas as amostras foram testadas para os cinco genes selecionados: *POLR1B*, *IKBKB*, *TRIP10*, *PGM5* e *ATM*.

A primeira análise realizada permitiu a avaliação da possível correlação entre os níveis de expressão relativa obtidos por RT-qPCR e pelos ensaios prévios de *microarray* de expressão para cada gene candidato.

A casuística do presente estudo compreendeu dois grupos de pacientes, o grupo de validação técnica e o grupo de validação biológica. O grupo de validação técnica incluiu 20 do total de 24 pacientes anteriormente estudados por *microarray* (Tabela 3). Quatro amostras não puderam ser incluídas nas análises finais por não terem apresentado resultados confiáveis para os genes de referência ou genes alvo, ou ainda, em alguns casos devido a quantidade insuficiente de RNA tumoral para as análises.

Foi detectada correlação positiva entre os níveis de transcritos detectados pelas duas metodologias para os cinco genes testados: *IKBKB*, *TRIP10*, *POLR1B*, *PGM5* e *ATM*, porém sem significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação entre valores de expressão relativa dos genes avaliados por *microarray* e RT-qPCR em 20 amostras de carcinomas mamários.

	Correlação de Spearman	
	R	P
<i>IKBKB</i>	0.232	0.324
<i>TRIP10</i>	0,132	0.578
<i>POLR1B</i>	0.197	0.418
<i>PGM5</i>	0.240	0.338
<i>ATM</i>	0.162	0.521

r = coeficiente de correlação;

Comparação dos níveis de expressão dos genes candidatos por RT-qPCR nos grupos de validação técnica e biológica

Foi avaliada a expressão dos genes alvo detectada por RT-qPCR entre amostras de pacientes que não desenvolveram metástase e daqueles que evoluíram para metástase do grupo de validação técnica (mesmas amostras analisadas por *microarray* de expressão) e comparados com um grupo independente de tumores (grupo de validação biológica). As Figuras 6 e 7 ilustram os resultados para os genes *IKBKB*, *TRIP10* e *POLR1B* e para os genes *PGM5* e *ATM*, respectivamente.

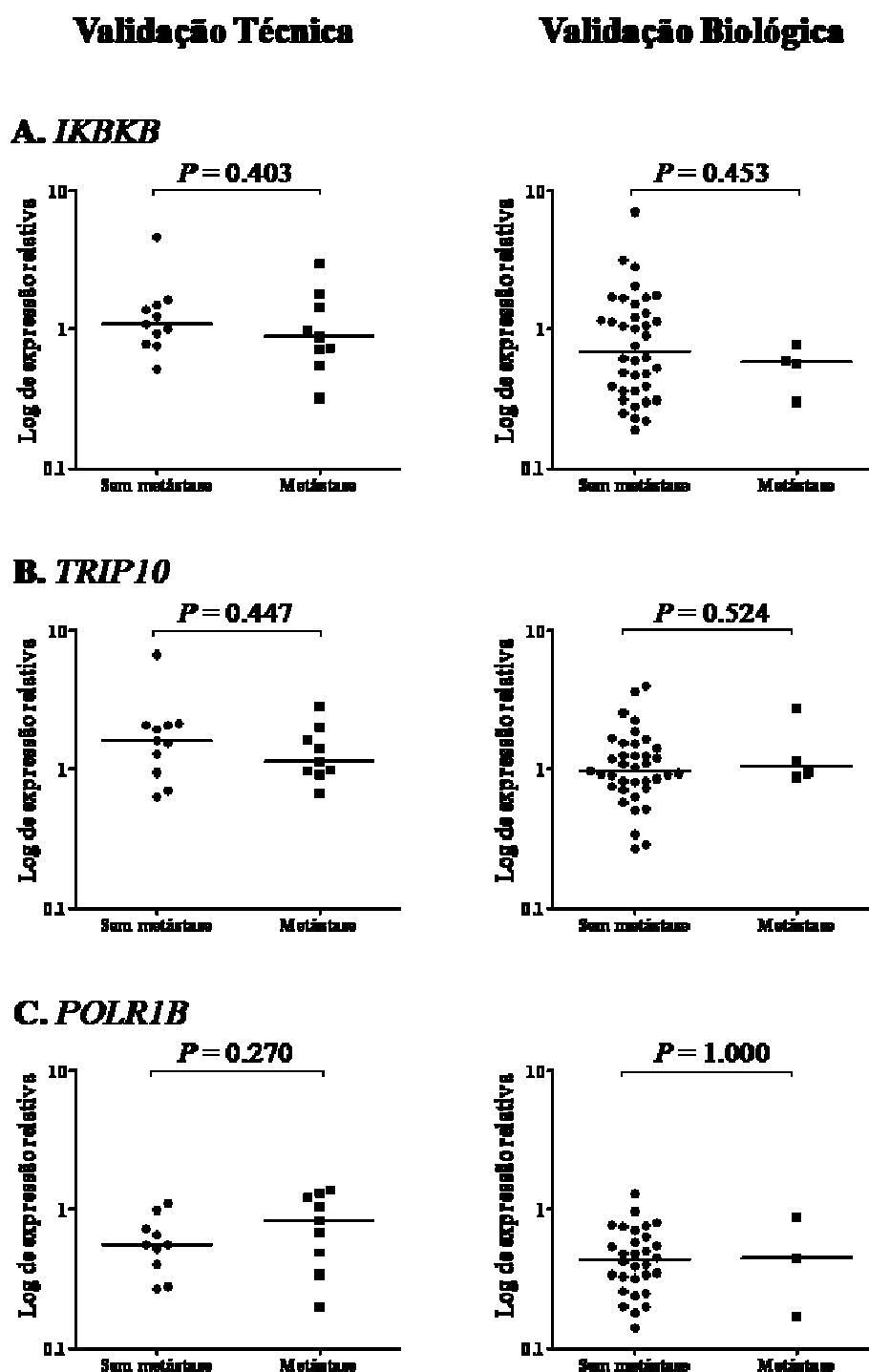


Figura 6 - Expressão relativa de *IKBKB*, *TRIP10* e *POLR1B* avaliados por RT-qPCR em amostras de carcinomas mamários de pacientes que não desenvolveram metástase e amostras de pacientes que evoluíram para metástase. A coluna esquerda mostra a comparação para o grupo de validação técnica (20 amostras previamente avaliadas pelo microarray) e biológica (43 novas amostras independentes). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa (log). O número de amostras variou entre porque alguns casos não mostraram resultados confiáveis ou detectáveis nos genes candidatos ou de referência.

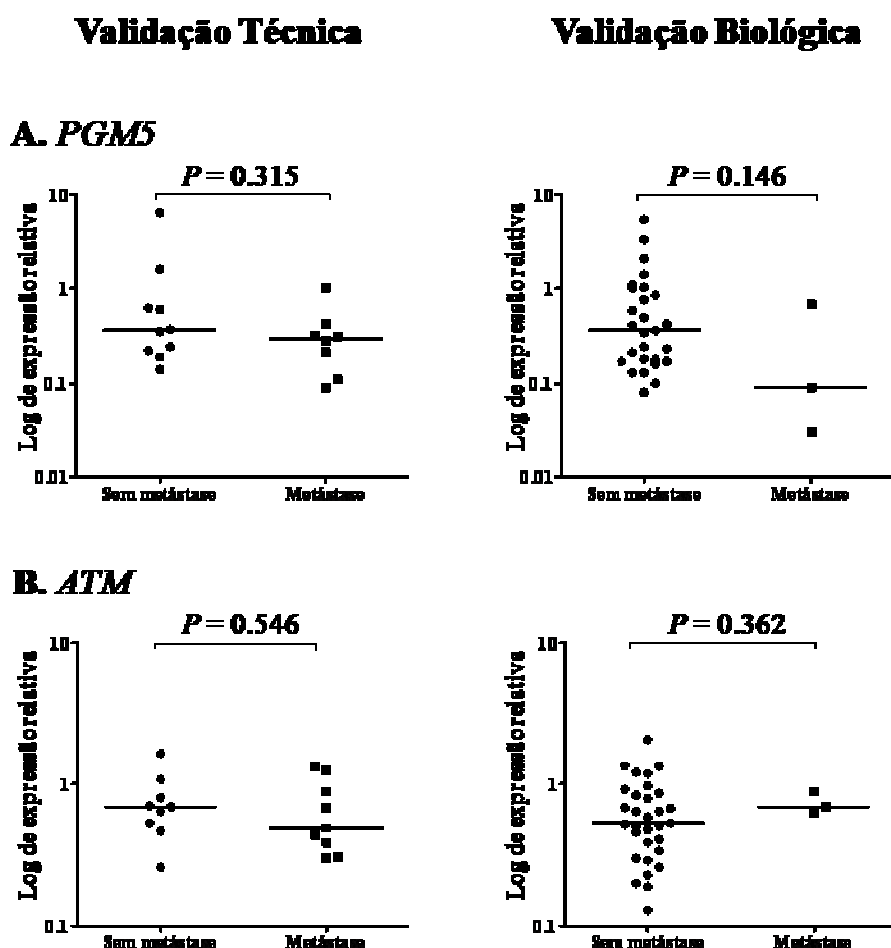


Figura 7 - Expressão relativa de *PGM5* e *ATM* avaliados por RT-qPCR em amostras de carcinomas mamários de pacientes que não desenvolveram metástase e amostras de pacientes que evoluíram para metástase. A coluna esquerda mostra a comparação para o grupo de validação técnica (20 amostras previamente avaliadas pelo microarray) e biológica (43 novas amostras independentes). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa (log). O número de amostras variou porque alguns casos não mostraram resultados confiáveis ou detectáveis nos genes candidatos ou de referência.

Vale ressaltar, que apenas quatro pacientes com metástase puderam ser incluídas no grupo de validação biológica, o que dificultou a análise deste grupo separadamente. No entanto, observou-se um comportamento semelhante entre as amostras de validação técnica e biológica. Sendo assim, estas amostras foram reagrupadas para as demais análises realizadas (comparação tumor vs tecido normal; comparação com as características clínicas e histopatológicas) com intuito de aumentar o poder estatístico. A seguir serão apresentados apenas os resultados referentes aos quatro genes

candidatos: *IKBKB*, *TRIP10*, *POLR1B* e *PGM5*. Os resultados referentes aos gene *ATM* estão incluídos no manuscrito em preparação.

Expressão gênica diferencial dos genes candidatos entre amostras de carcinomas mamários e controles

Nas comparações feitas entre o grupo de amostras de carcinomas mamários e as amostras normais não foi observada diferença significativa para os genes *IKBKB* ($P = 0.545$) e *TRIP10* ($P = 0.702$). Pelo fato do gene *POLR1B* apresentar expressão tardia no tecido mamário, o número de amostras normais que apresentou resultado considerado confiável foi limitado ($n=2$), portanto não foi possível a aplicação de teste estatístico. O gene *PGM5* mostrou diminuição de expressão nos tumores, porém sem diferença estatística ($P = 0.075$), como demonstrado na Figura 8.

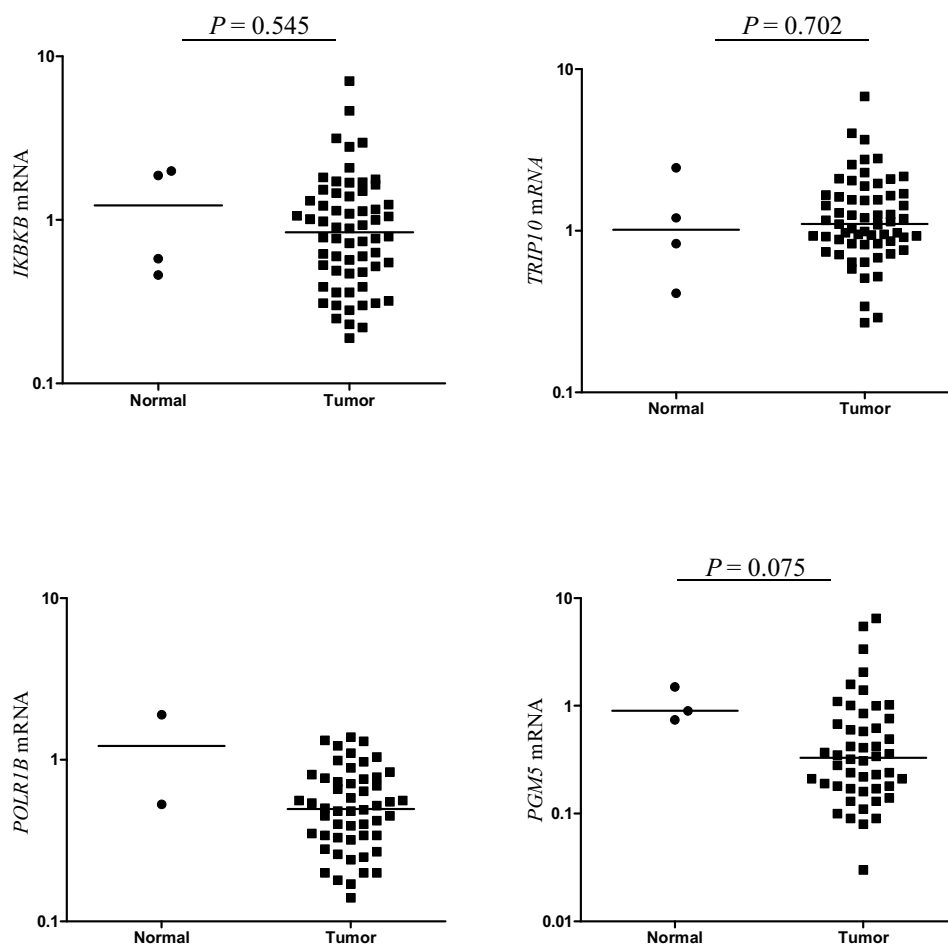


Figura 8 - Expressão relativa dos genes *IKBKB*, *TRIP10*, *POLR1B* e *PGM5* avaliados por RT-qPCR em carcinomas mamários (N=63) e tecidos normais (N=5). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa dos tumores em relação à mediana dos normais. A mediana de expressão de cada gene em cada grupo está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney. Os níveis de expressão relativa de cada gene estão apresentados em escala logarítmica. O número de amostras (normais e tumorais) variou porque alguns casos não mostraram resultados confiáveis ou detectáveis nos genes candidatos ou de referência.

Expressão relativa dos genes e as variáveis clínicas e histopatológicas

Para avaliar se os genes estudados poderiam estar associados com características de pior prognóstico ou outra característica clínica, os dados foram comparados a todos os parâmetros clínicos e histopatológicos disponíveis, como idade, história familiar, tamanho do tumor (T), linfonodos comprometidos (N), estadió patológico, grau

histológico, receptores hormonais (ER e PR), HER-2, tumores triplo-negativos (ER-PR-HER2- vs demais) e metástase.

As figuras 9, 10, 11 e 12, mostram os níveis de expressão dos genes *IKBKB*, *TRIP10*, *POLR1B* e *PGM5*, respectivamente, de acordo com as principais características avaliadas.

Para o gene *IKBKB* (Figura 9), foi observado um aumento significativo dos níveis de transcritos tanto em tumores ER-positivos ($P < 0.001$, Figura 9E) quanto em casos HER2-negativos ($P = 0.008$, Figura 9G). Não houve associação significativa com os outros dados clínicos e histopatológicos avaliados.

O gene *TRIP10* (Figura 10), apresentou associação significativa apenas com relação ao HER2, onde os tumores HER2-negativos apresentavam maiores níveis de transcritos ($P = 0.009$, Figura 10G). A análise dos níveis de *TRIP10* em relação ao grau histológico mostrou níveis mais baixos nos tumores de grau III comparados com tumores grau I ($P = 0.048$, Teste de Mann-Whitney).

Com relação ao gene *POLR1B* (Figura 11), houve diminuição significativa nos níveis de mRNA em tumores ER-negativos ($P = 0.004$, Figura 11E) e marginalmente nos tumores triplo negativos ($P = 0.049$, dados não apresentados). A comparação entre os níveis de *POLR1B* e grau histológico mostrou níveis menores de transcritos nos tumores de grau III comparados ao tumores de grau I ($P = 0.026$, teste de Mann-Whitney).

O gene *PGM5* (Figura 12) apresentou uma diminuição significativa da expressão dos transcritos gradativamente com o aumento do grau tumoral ($P = 0.003$, Figura 12D), sendo que níveis mais baixos foram detectados nos tumores grau III comparados com grau I ($P = 0.011$, teste de Mann-Whitney) e com grau II ($P = 0.003$, teste de Mann-Whitney). A diminuição nos níveis de mRNA foram observados nos tumores ER-negativos ($P = 0.002$, Figura 12E) e HER2-positivos ($P = 0.007$, Figura 12G).

Em conclusão, as análises dos genes candidatos não confirmaram os achados de expressão gênica global que mostrou associação destes genes com metástase nos carcinomas mamários.

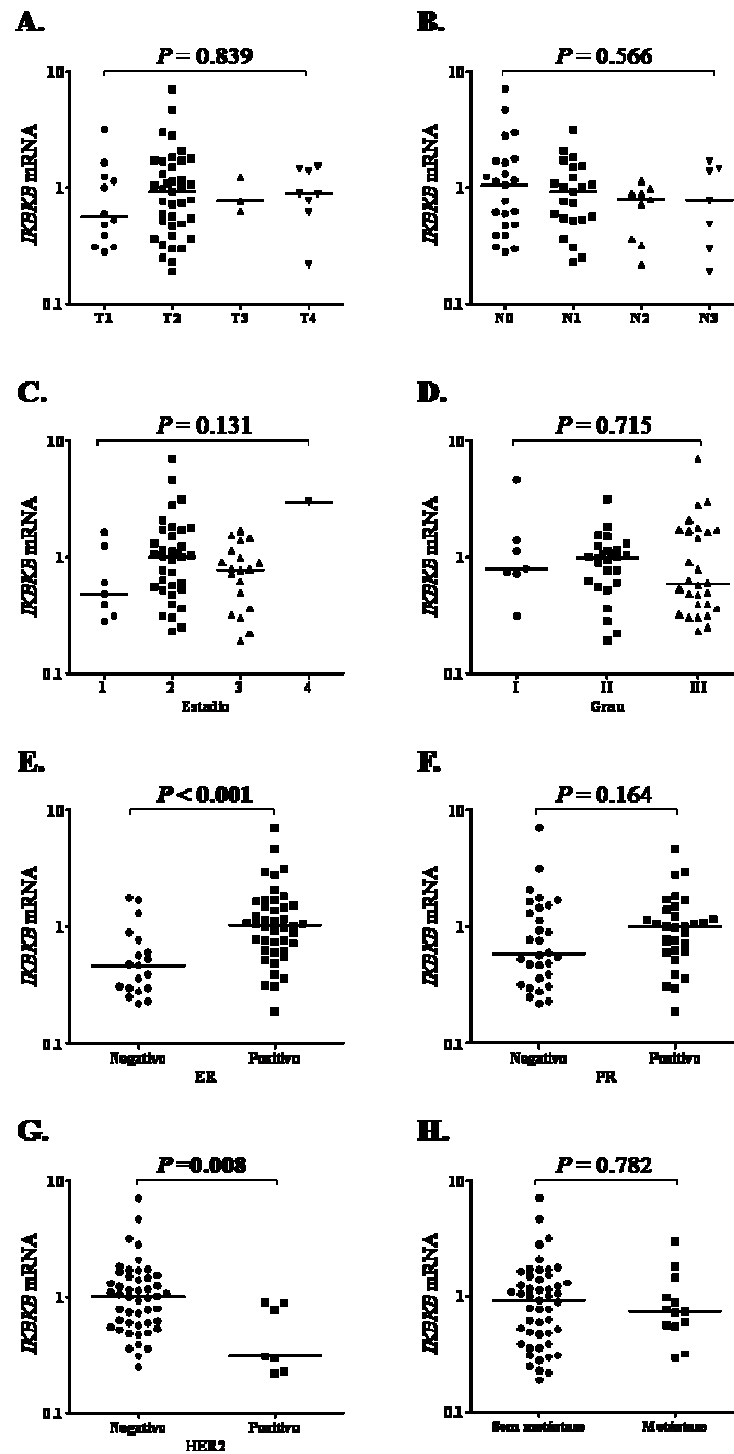


Figura 9 - Níveis dos transcritos de *IKBKB* segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadiio patológico; **D.** grau; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor de fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Esta apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica avaliada. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre os pares e para múltiplas comparações foi usado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

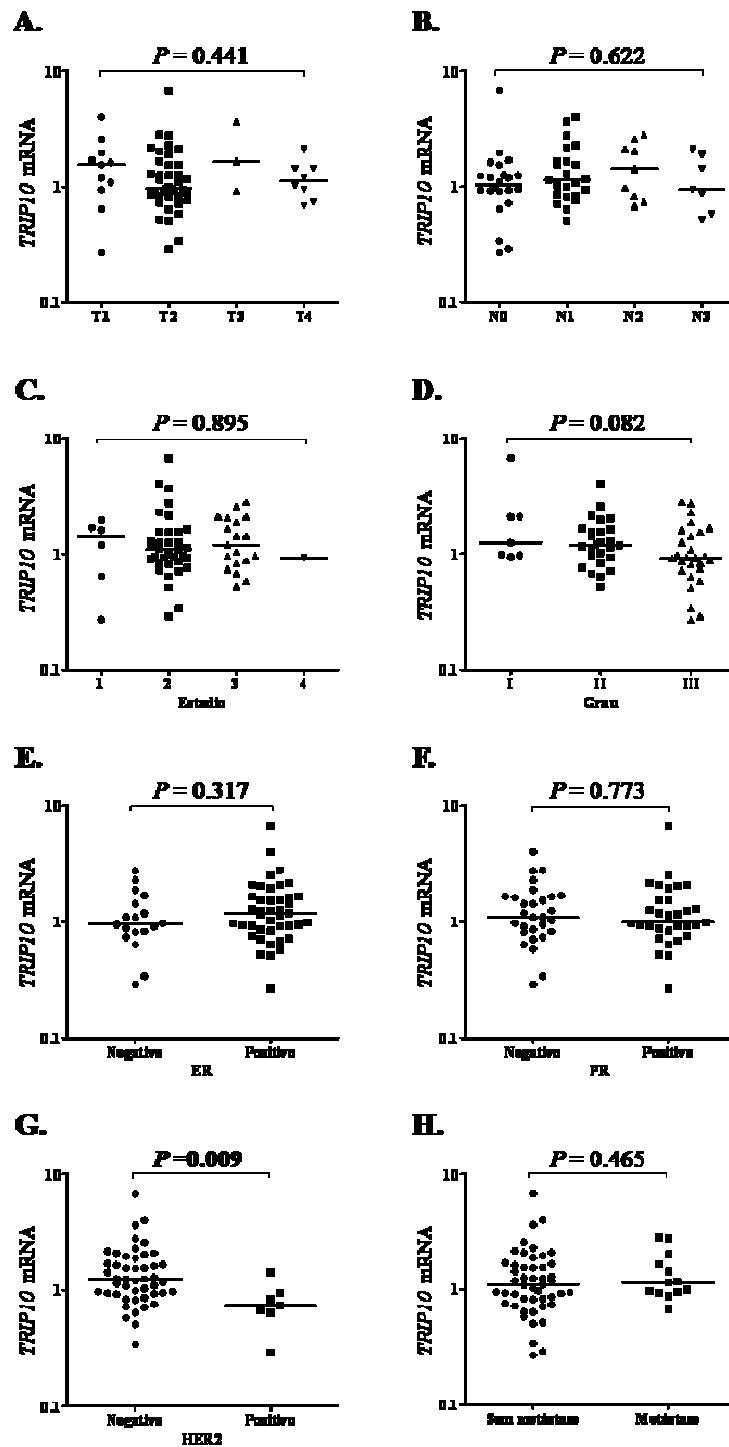


Figura 10 - Níveis dos transcritos de *TRIP10* segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** Grau histológico; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor de fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

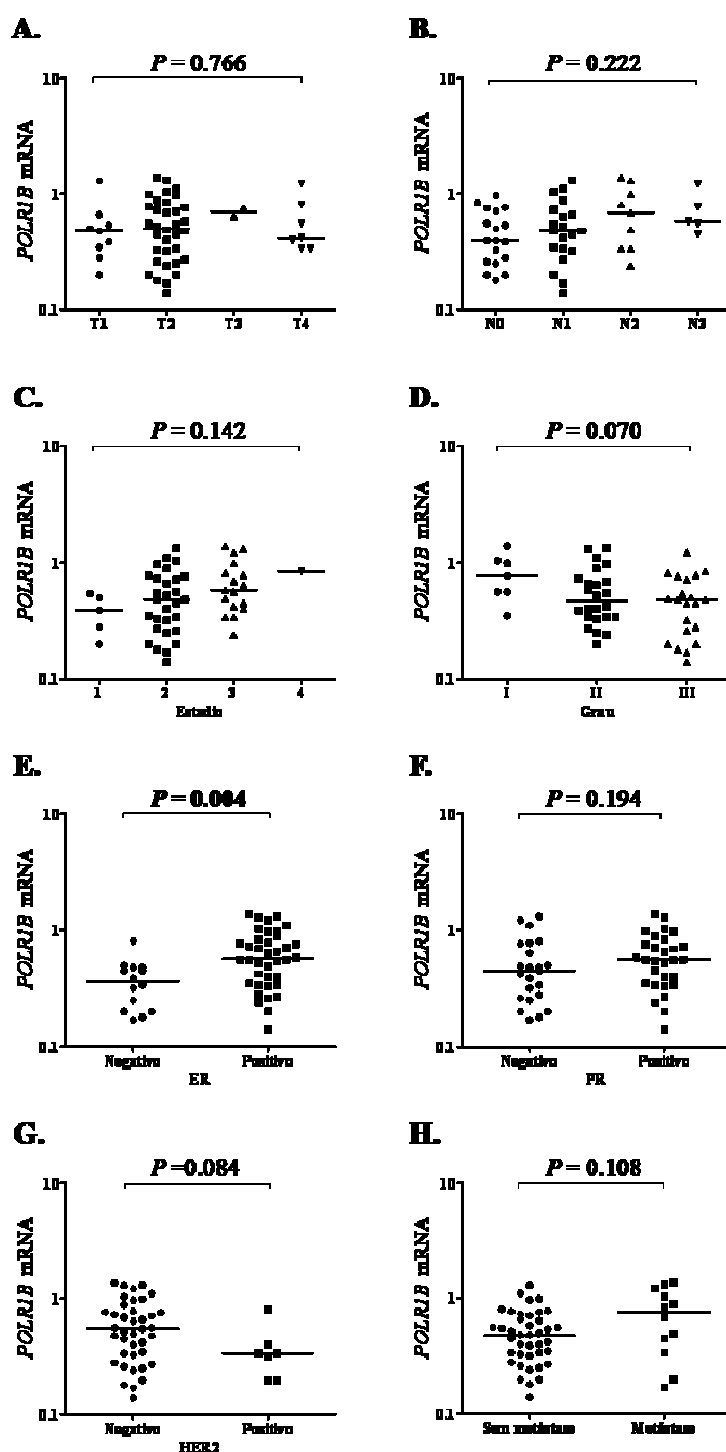


Figura 11 - Níveis dos transcritos de *POLR1B* segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** Grau histológico; **E.** receptor do estrógeno (ER); **F.** receptor da progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Esta apresentada a mediana de expressão de cada gene para cada característica. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

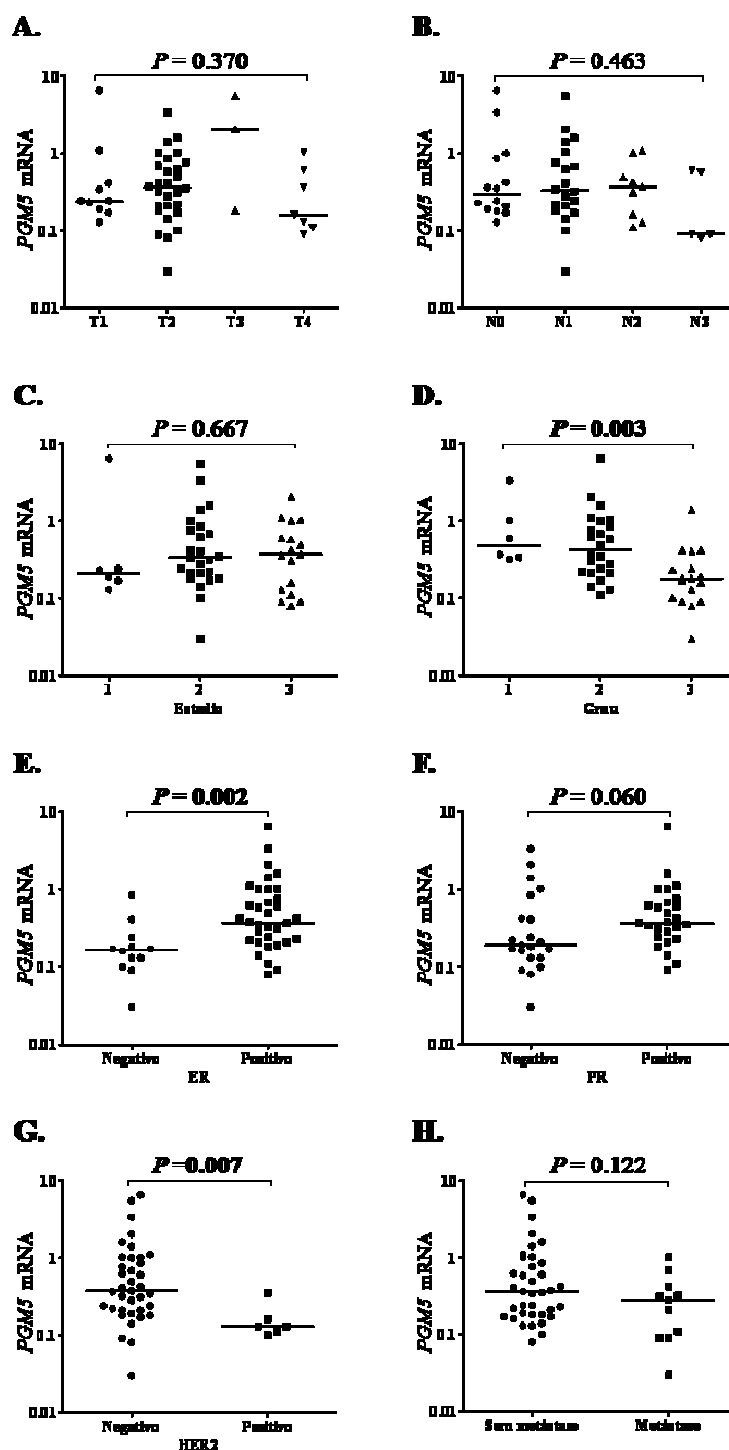


Figura 12 - Níveis dos transcritos de *PGM5* segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** Grau histológico; **E.** receptor do estrógeno (ER); **F.** receptor da progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana da expressão de cada gene para cada característica. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

Expressão relativa dos miRNAs: miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a

Escolha das referências para a normalização de RT-qPCR dos miRNAs

A partir de um estudo realizado por Davoren et al. (2008) em amostras de tumores mamários, foram selecionados como possíveis miRNAs de referência dois transcritos codificantes de miRNAs (Let-7-a e miR-16) em conjunto com quatro transcritos codificadores de pequenos RNAs nucleolares (RNU44, RNU48, RNU6B e RNU47) selecionados conforme nota de aplicação da empresa Applied Biosystems, que demonstraram expressão pouco variável em outros tecidos tumorais. O pré-teste para a análise de expressão de miRNAs incluiu cinco controles (quatro amostras de tecido mamário normal e uma amostra de linhagem de mama normal - HB4) e oito amostras de carcinomas mamários (Figura 13).



1.5	Let-7a	miR-16	RNU48	RNU44	U47	RNU6B	Normalisation Factor
HB4	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.4554
1042N	1.41E+00	1.45E+00	1.58E+00	1.13E+00	3.22E+00	4.01E+00	0.8659
1283N	4.75E+00	2.45E+00	2.12E+00	1.19E+00	3.36E+00	6.14E+00	1.3245
543	3.54E+00	1.96E+00	3.62E+00	1.40E+00	1.65E+00	1.17E+01	1.4552
594	4.27E+00	3.67E+00	2.49E+00	9.32E+01	2.08E+00	8.58E+00	1.3395
680	4.33E+00	3.41E+00	3.21E+00	1.53E+00	1.99E+00	1.38E+01	1.6144
562	1.00E+00	8.74E-01	8.38E-01	3.09E-01	7.36E-01	1.61E+01	0.5369
1043N	1.03E+00	7.18E-01	3.64E-01	5.50E-02	8.80E-02	9.85E-01	0.1802
1279N	3.55E+00	2.79E+00	3.08E+00	1.51E+00	4.09E+00	7.05E+00	1.5109
609	8.95E-01	1.59E+00	1.34E+00	8.37E-01	1.02E+00	9.25E+00	0.7161
1016	8.21E-01	3.03E+00	3.30E+00	2.12E+00	3.33E+00	4.02E+00	1.1294
835	3.21E+00	2.38E+00	1.31E+01	4.05E+00	8.73E+00	8.53E+00	2.5405
572	9.61E+00	3.11E+00	4.22E+00	2.68E+00	4.24E+00	1.61E+01	2.4297
M < 1.5	1.225	1.021	0.926	1.040	1.090	1.308	

Figura 13 - Expressão relativa, fator de normalização e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos seis transcritos (miR-16, Let-7-a, RNU6B, RNU44, RNU47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados. Observa-se que o RNU48 apresentou expressão mais estável (verde) individualmente e RNU6B é o mais variável (vermelho) nas 13 amostras de tecido mamário testadas (5 amostras não-tumorais e 8 tumorais). O fator de normalização representa a média geométrica da expressão relativa dos seis candidatos avaliados.

Os resultados do teste demonstrou que RNU6B e Let-7-a apresentavam expressão muito variável para uso como calibradores de expressão dos miRNAs (M=1.308 e 1.225

respectivamente). Após a remoção em série dos transcritos menos estáveis, o programa geNorm indicou que RNU44 + RNU47 era o melhor par de transcritos, seguidos da inclusão de RNU48, miR-16, Let-7-a e RNU6B, respectivamente (Figura 14).

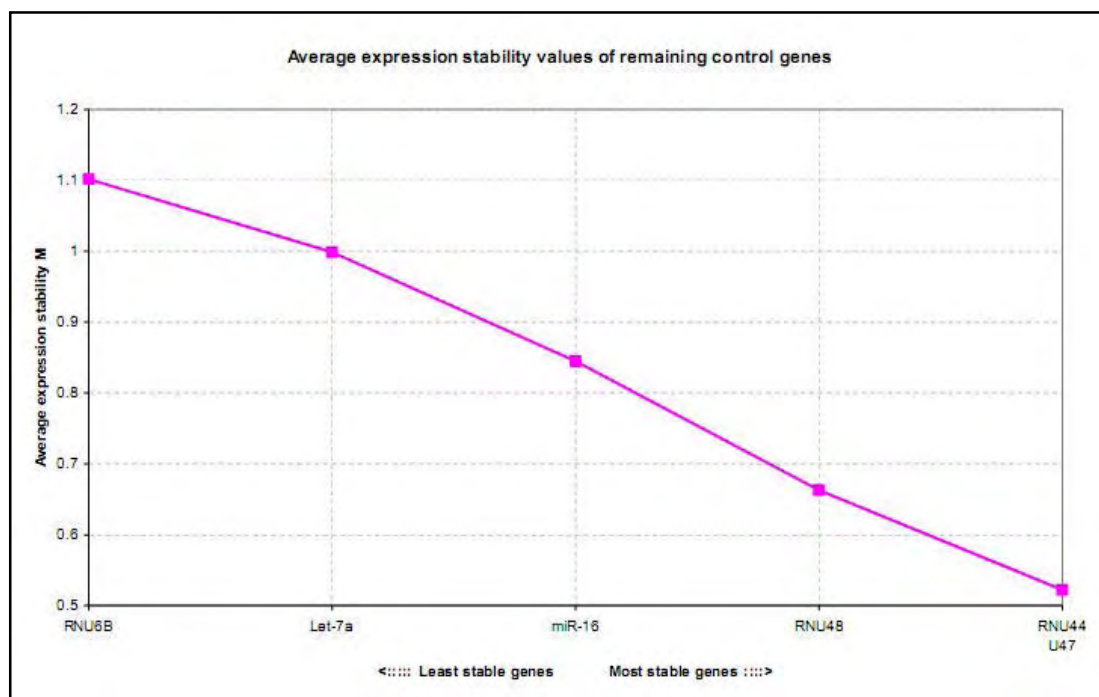


Figura 14 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos (RNU44, RNU47, RNU48, miR-16, Let-7-a, RNU6B) candidatos a normalizadores. O cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável, indicou o RNU44 + RNU47 como o melhor par de genes.

O conjunto de microRNAs para referência apropriado foi também estimado e esta análise mostrou que deveriam ser utilizados seis microRNAs de referência para a normalização da expressão dos microRNAs nas amostras de carcinomas mamários. Isso porque o menor desvio entre os fatores de normalização foi obtido na inclusão do sexto transcrito (RNU6B) ao grupo prévio com os cinco ($V5/6 = 0.190$). Entretanto, mesmo com tantos microRNAs de referência, não foi possível atingir o ideal ($<0,150$) proposto por Vandesompele et al. (2002), no qual a adição de um novo transcrito para a normalização seria redundante.

Considerando a quantidade limitada das amostras de RNA dos tumores e que não houve diferença significativa após a adição do quarto microRNA de referência (a adição

do miR-16 não alterou de forma significativa a relação dos fatores de normalização com apenas os três microRNAs mais estáveis, V3/4=0,241), optou-se por utilizar três microRNAs de referência: RNU44, RNU47 e RNU48. Vale ressaltar que a seleção de três microRNAs de referência permite que a estabilidade de expressão no total de amostras e ao final das análises seja confirmada quanto a estabilidade destes microRNAs de referência (três é o número mínimo de microRNAs para a análise pelo programa geNorm). (Figura 15). Assim, as demais amostras foram avaliadas incluindo apenas as referências RNU44, RNU47, e RNU48

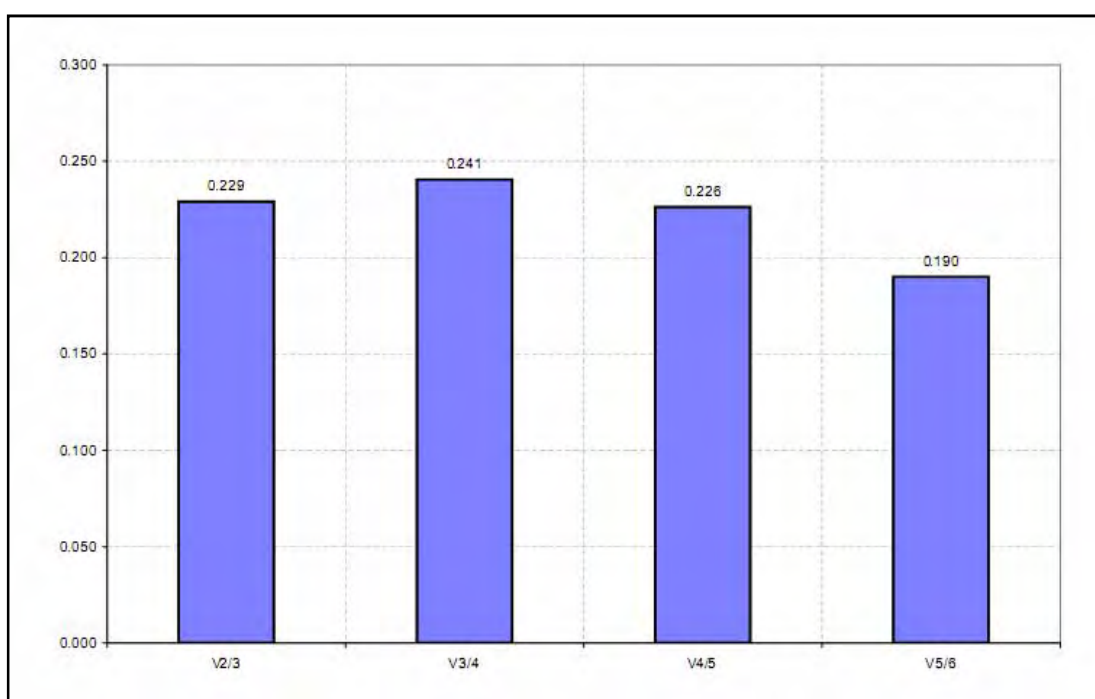


Figura 15 - Determinação do número adequado dos transcritos (miR-16, Let-7-a, RNU6B, RNU44, RNU47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados. O uso dos seis transcritos mais estáveis (5/6) permitiu a normalização de maior fidelidade (RNU44, RNU47, RNU48, miR-16, Let-7-a e RNU6B). Esta análise estima o número de transcritos de referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização.

Expressão diferencial dos miRNAs entre as amostras de carcinomas mamários e controles

Foram realizadas comparações entre as amostras tumorais e normais, mostrando uma diminuição significativa dos níveis de expressão dos microRNAs da família do miR-26, miR-26a e miR-26b, nas amostras tumorais ($P = 0.003$ e $P = 0.014$, respectivamente,

Figura 16A e Figura 16B). Esta mesma comparação foi realizada para o miR-18a sendo detectado um aumento significativo do seu nível nas amostras tumorais ($P = 0.032$, Figura 16G).

Os demais microRNAs analisados, não apresentaram diferenças significativas entre as amostras tumorais e normais (Figura 16): miR-203 ($P = 0.557$, Figura 16C), miR-421 ($P = 0.391$, Figura 16D), miR-576-5p ($P = 0.133$, Figura 16E) e miR-664 ($P = 0.210$, Figura 16F).

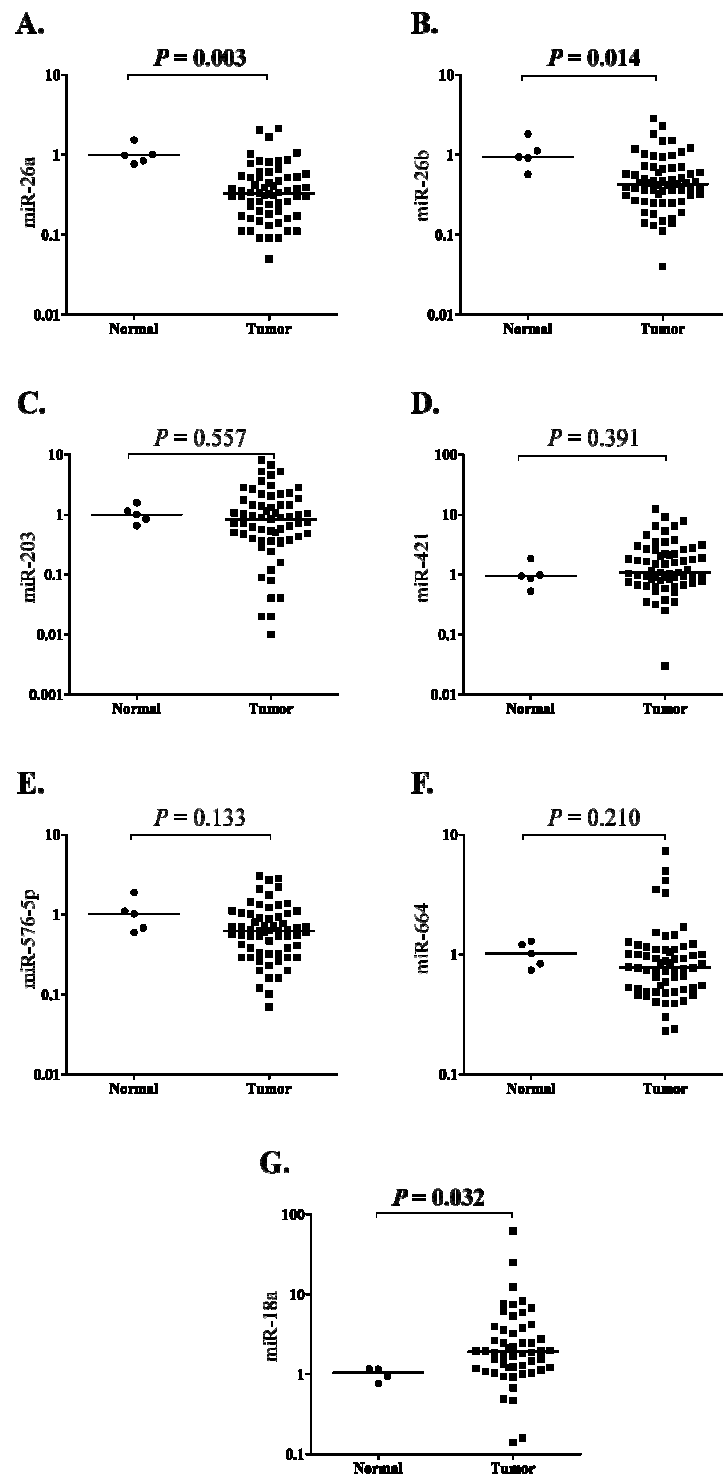


Figura 16 - Expressão relativa de miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a avaliados por RT-qPCR em amostras de tecido mamário (N=63) e tecidos normais (N=5). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa dos tumores em relação à mediana dos tecidos normais. Está apresentada a mediana da expressão de cada miRNA em cada grupo. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

Expressão relativa dos miRNAs e as variáveis clínicas e histopatológicas

Os dados dos níveis de expressão dos miRNAs testados foram comparados aos parâmetros clínicos e histopatológicos disponíveis, como idade, história familiar, tamanho do tumor (T), linfonodos comprometidos (N), estadió patológico, grau histológico, receptores hormonais (ER e PR), HER-2, tumores triplo-negativos (ER-PR-HER2- vs demais) e metástase.

As Figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23 ilustram os níveis de expressão de miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a, respectivamente, de acordo com as variáveis.

Nas análises do miR-26a (Figura 17), foi observada uma diminuição gradativa significativa dos níveis de transcritos conforme o aumento do grau tumoral ($P = 0.008$, Figura 17D), com uma diminuição significativa observada nos tumores grau III comparado aos grau II ($P = 0.005$, teste de Mann-Whitney). Foram observados menores níveis em tumores ER-negativos ($P = 0.006$, Figura 17E), bem como em tumores triplo-negativos ($P = 0.020$, dados não mostrados).

O miR-26b (Figura 18) assim como o miR-26a apresentaram uma diminuição gradativa significativa da expressão dos transcritos conforme o aumento do grau tumoral ($P = 0.008$, Figura 18D), sendo que diminuição significativa foi observada nos tumores grau III comparado aos tumores grau I ($P = 0.039$, teste de Mann-Whitney) e ao tumores grau II ($P = 0.005$, teste de Mann-Whitney). Foram observados menores níveis de miR-26b em tumores ER-negativos ($P = 0.003$, Figura 18E) assim como em tumores triplo-negativos ($P = 0.004$, dados não apresentados).

Um aumento significativo nos níveis do miR-203 (Figura 19) foi observado em tumores HER2-positivos ($P = 0.022$, Figura 19G). Não foram detectadas associações significativas deste microRNA com os outros dados clínicos e histopatológicos.

Nas análises realizadas com o miR-421 (Figura 20), foi observado um aumento na quantidade deste transcrito em tumores de pacientes com história familiar positiva ($P = 0.009$, dados não apresentados). Também se observou nesta análise uma diminuição dos níveis deste transcrito em tumores PR-positivos ($P = 0.003$, Figura 20F).

Para o miR-576-5p (Figura 21), foi verificada a diminuição dos níveis do transcrito em tumores PR-positivos ($P = 0.035$, Figura 21F), igualmente ao observado na

análise do miR-664 ($P = 0.024$, Figura 22F). Os outros dados clínicos e histopatológicos não foram associados significativamente com os níveis de expressão destes microRNAs.

Foi detectado um aumento significativo do nível de expressão do miR-18a conforme o aumento do grau tumoral ($P = 0.001$, Figura 23D). Os tumores grau III apresentaram um aumento significativo quando comparados aos tumores de grau II ($P = 0.003$, teste de Mann-Whitney) e aos tumores de grau I ($P = 0.002$, teste de Mann-Whitney). Nos tumores ER-positivos foram observadas diminuições significativas da expressão do miR-18a ($P = 0.005$, Figura 23E), assim como em tumores PR-positivos ($P = 0.003$, Figura 23F) e em tumores HER2-negativos ($P = 0.002$, Figura 23G).

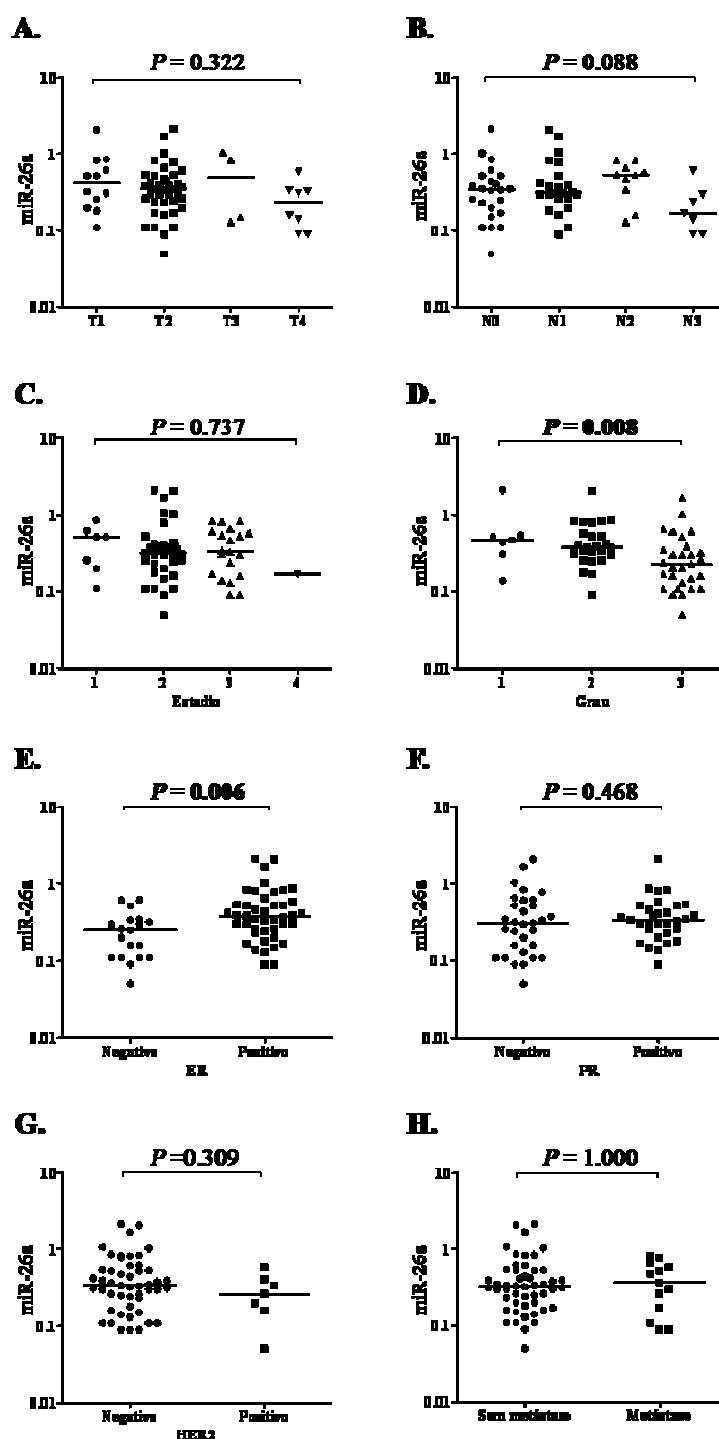


Figura 17 - Níveis dos transcritos de miR-26a segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** grau; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi usado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

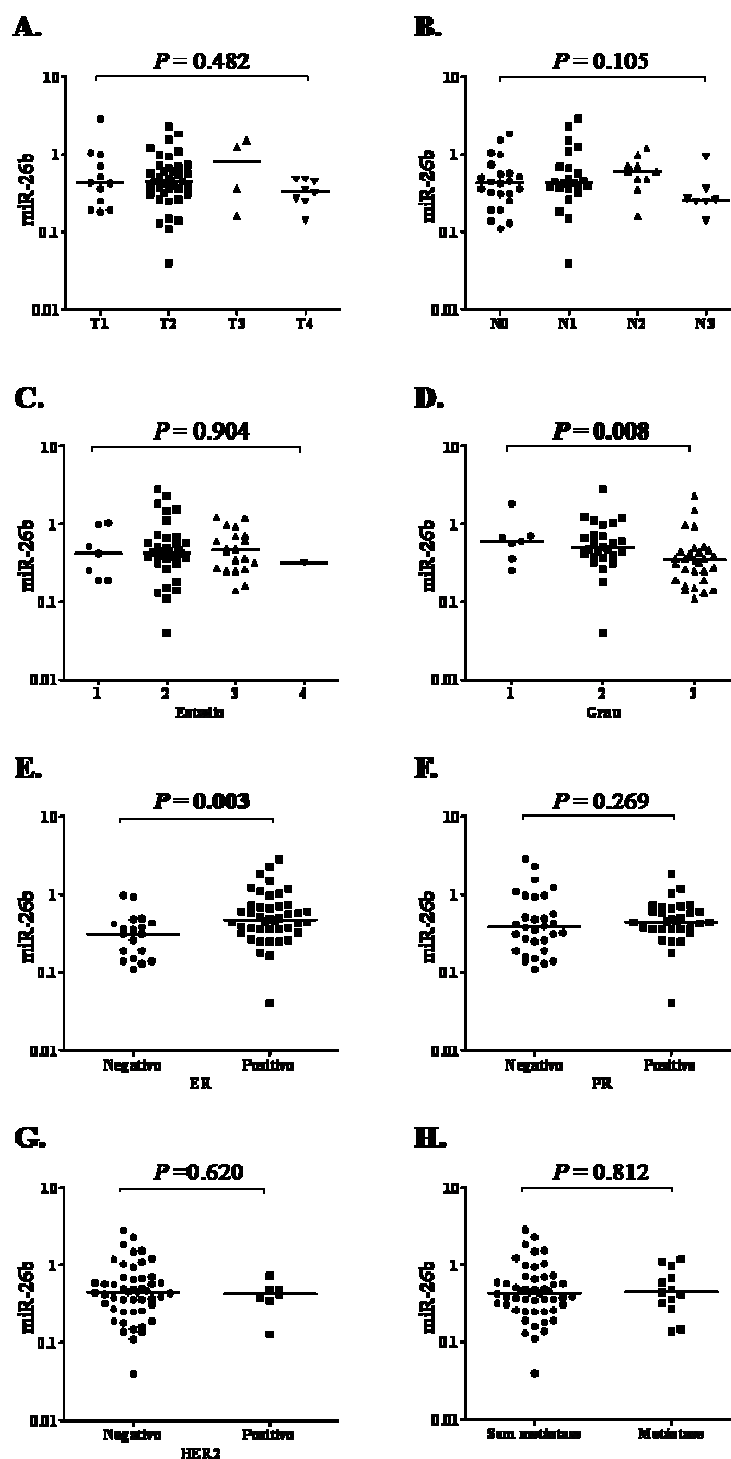


Figura 18 - Níveis dos transcritos de miR-26b segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** grau; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

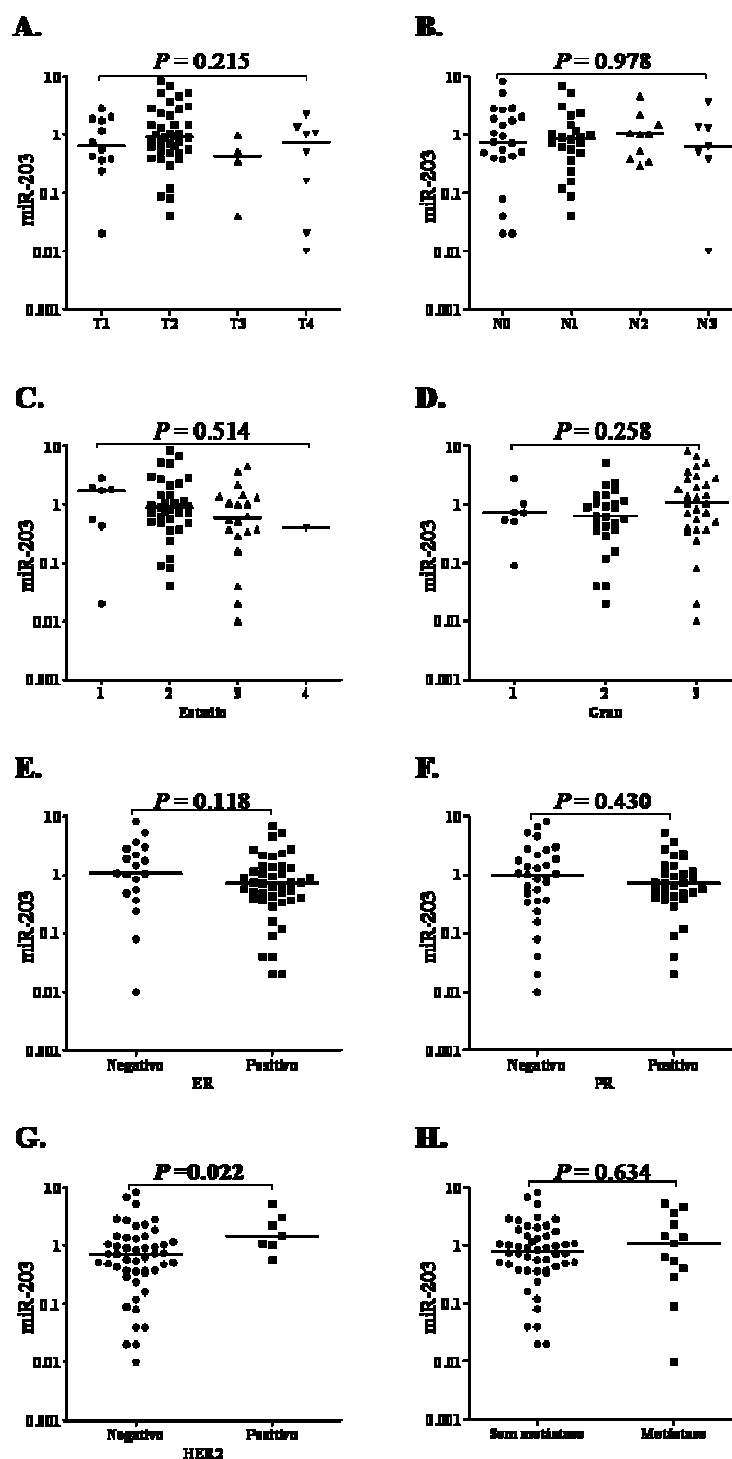


Figura 19 - Níveis dos transcritos de miR-203 segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** Grau tumoral; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

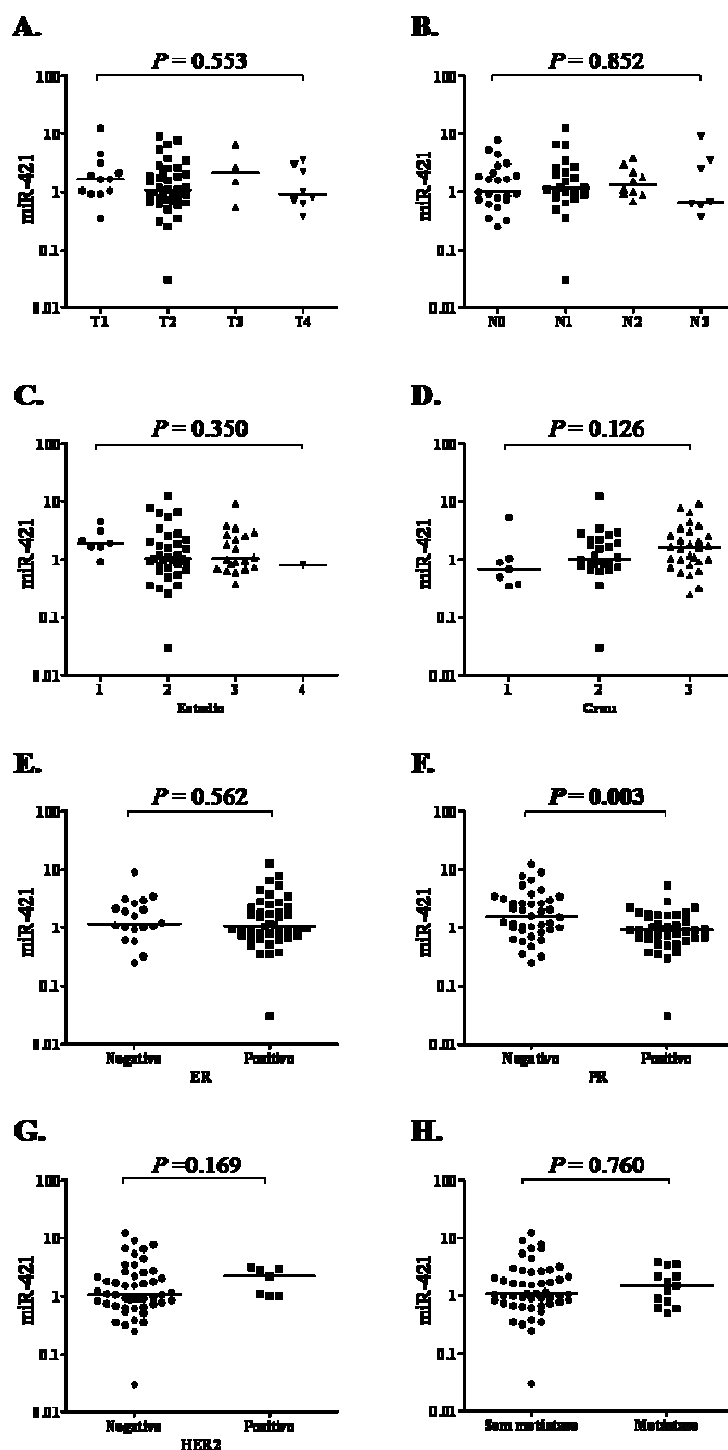


Figura 20 - Níveis dos transcritos de miR-421 segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** Grau tumoral; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

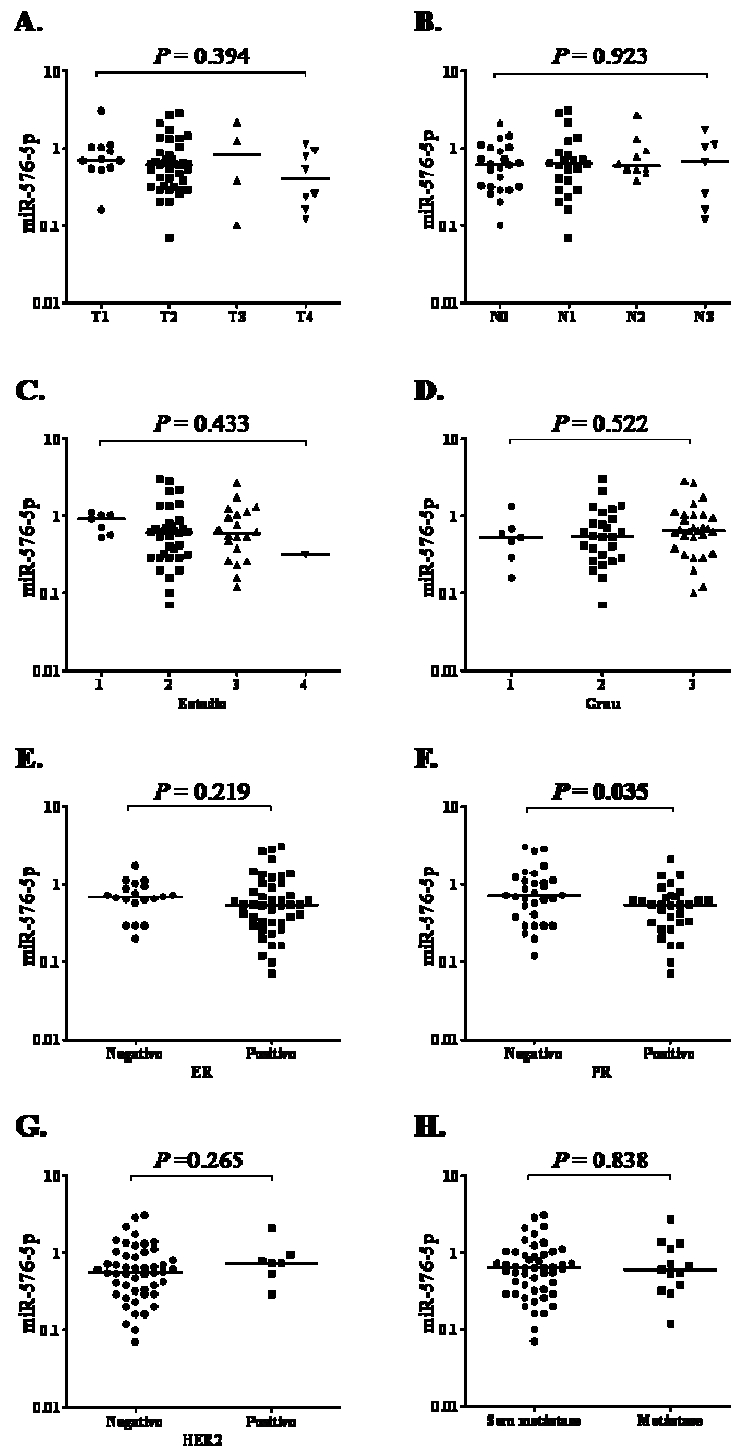


Figura 21 - Níveis dos transcritos de miR-576-5p segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** grau tumoral; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi usado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

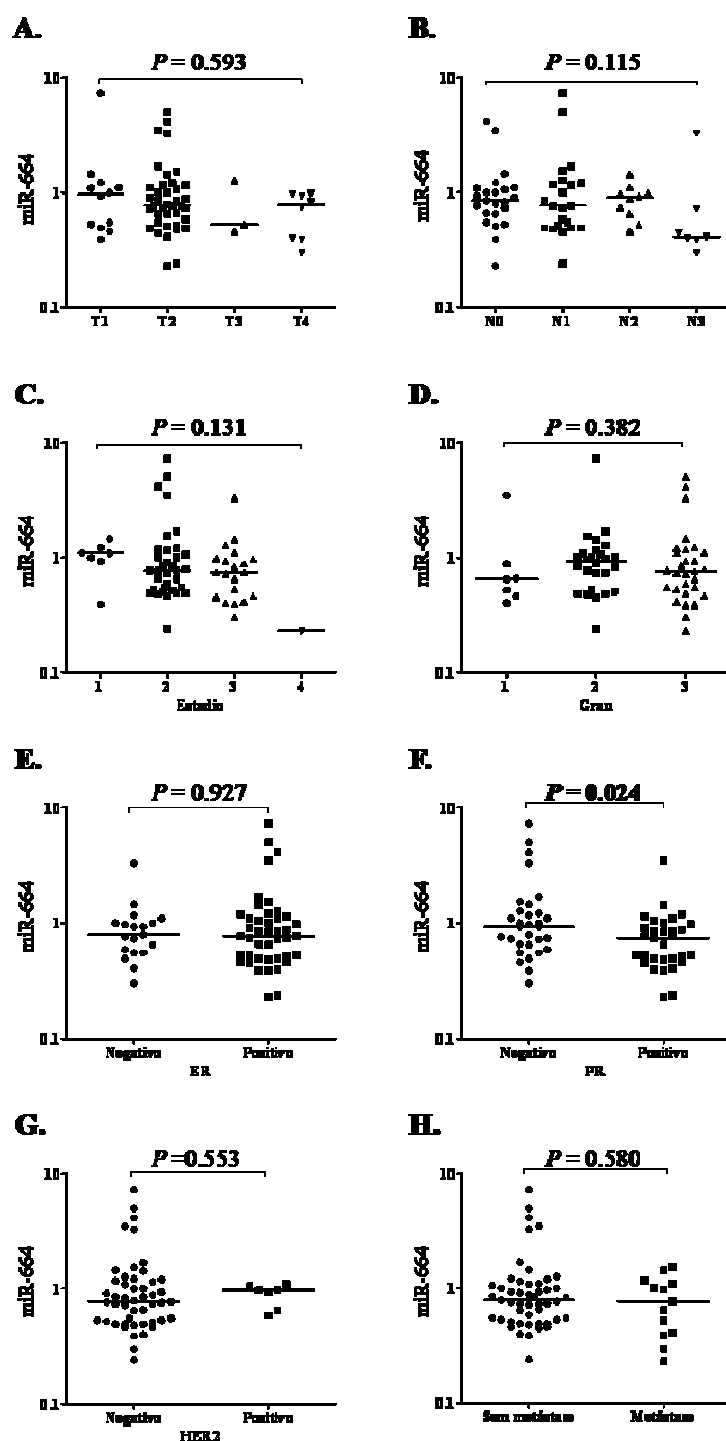


Figura 22 - Níveis dos transcritos de miR-664 segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadiio patológico; **D.** grau tumoral; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi usado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

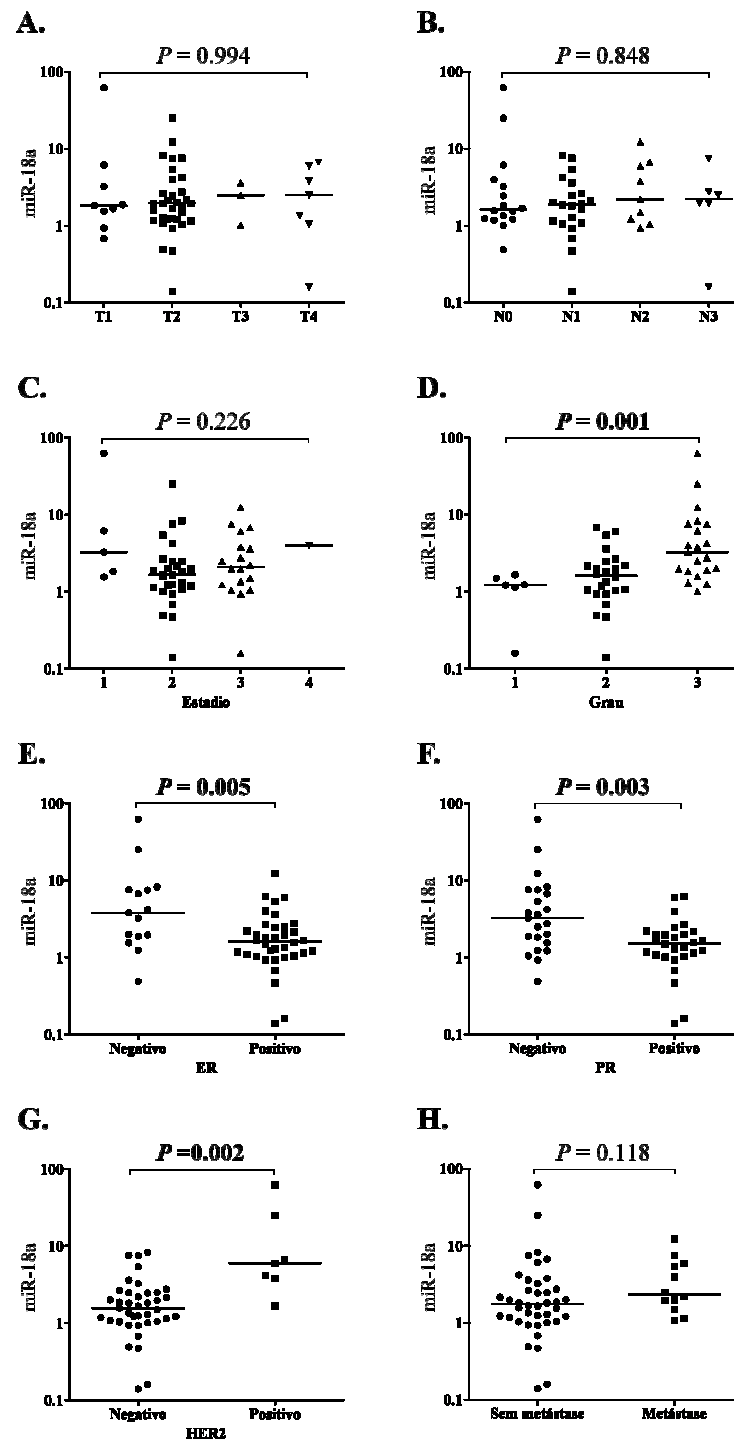


Figura 23 - Níveis dos transcritos de miR-18a segundo: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** grau tumoral; **E.** receptor de estrógeno (ER); **F.** receptor de progesterona (PR); **G.** receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); e **H.** Metástase. Está apresentada a mediana de expressão de cada miRNA para cada característica. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e para múltiplas comparações foi usado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Cancer Association. Breast cancer facts & figures – 2011/2012. Acesso em: 16 de dezembro de 2011. Disponível em: <http://www.cancer.org>.
- Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(3):R149-56.
- Baehner FL, Achacoso N, Maddala T, Shak S, Quesenberry CP, Jr., Goldstein LC, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 assessment in a case-control study: comparison of fluorescence in situ hybridization and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction performed by central laboratories. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 1;28(28):4300-6.
- Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer.* 2008 Mar 1;122(5):969-77.
- Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. *Lancet.* 2009 Apr 25;373(9673):1463-79.
- Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 6;101(27):10137-42.
- Bogdanova N, Cybulski C, Bermisheva M, Datsyuk I, Yamini P, Hillemanns P, et al. A nonsense mutation (E1978X) in the ATM gene is associated with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Nov;118(1):207-11.
- Brandes JC, Carraway H, Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene.* 2007 Sep 13;26(42):6229-37.
- Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Sep 6;98(17):1183-92.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Dec;7(12):683-92.

- Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.* 2004 Feb;2(2):E7.
- Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer. *Br J Cancer.* 2005 Feb 28;92(4):618-24.
- Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, et al. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* 2006 Mar;3(3):e47.
- Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell.* 2006 Dec;10(6):529-41.
- Cicek M, Fukuyama R, Welch DR, Sizemore N, Casey G. Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor-kappaB activity. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3586-95.
- Comen EA, Norton L, Massague J. Breast cancer tumor size, nodal status, and prognosis: biology trumps anatomy. *J Clin Oncol.* 2011 Jul 1;29(19):2610-2.
- Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS.* 2007 Oct;115(10):1090-106.
- de Snoo F, Bender R, Glas A, Rutgers E. Gene expression profiling: decoding breast cancer. *Surg Oncol.* 2009 Dec;18(4):366-78.
- Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, Tubbs RR, Shuai Y, Bhargava R. High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 10;29(32):4279-85.
- Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol.* 2008;9:76.
- Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B, et al. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res.* 2007 Jun 1;13(11):3207-14.

- Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med*. 2010 Jun;16(6):257-67.
- Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 20;26(18):3057-62.
- Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*. 2005 Mar;51(3):494-503.
- Einarsdottir K, Rosenberg LU, Humphreys K, Bonnard C, Palmgren J, Li Y, et al. Comprehensive analysis of the ATM, CHEK2 and ERBB2 genes in relation to breast tumour characteristics and survival: a population-based case-control and follow-up study. *Breast Cancer Res*. 2006;8(6):R67.
- Espinosa E, Gamez-Pozo A, Sanchez-Navarro I, Pinto A, Castaneda CA, Ciruelos E, et al. The present and future of gene profiling in breast cancer. *Cancer Metastasis Ver*. 2011 Nov 29.
- Foekens JA, Atkins D, Zhang Y, Sweep FC, Harbeck N, Paradiso A, et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 10;24(11):1665-71.
- Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: future perspectives. *Oral Oncol*. 2008 Oct;44(10):910-4.
- Halsted WS. I. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg*. 1907 Jul;46(1):1-19.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1474-81.
- Hsu CC, Leu YW, Tseng MJ, Lee KD, Kuo TY, Yen JY, et al. Functional characterization of Trip10 in cancer cell growth and survival. *J Biomed Sci*. 2011;18:12.
- Hu H, Du L, Nagabayashi G, Seeger RC, Gatti RA. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26;107(4):1506-11.
- Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell*. 2008 May;13(5):394-406.

- Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, et al. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004 Apr 16;117(2):225-37.
- Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7495-8.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). Tipos de câncer: Mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2011. Acesso em: 16 de dezembro de 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
- Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K. NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci*. 2007 Mar;98(3):268-74.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065-70.
- Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5848-56.
- Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *Breast*. 2011 Oct;20 Suppl 3:S63-70.
- Jiang R, Xia Y, Li J, Deng L, Zhao L, Shi J, et al. High expression levels of IKKalpha and IKKbeta are necessary for the malignant properties of liver cancer. *Int J Cancer*. 2010 Mar 1;126(5):1263-74.
- Joosse SA, Brandwijk KI, Mulder L, Wesseling J, Hannemann J, Nederlof PM. Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Feb;50(2):71-81.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1315-26.
- Lancashire LJ, Powe DG, Reis-Filho JS, Rakha E, Lemetre C, Weigelt B, et al. A validated gene expression profile for detecting clinical outcome in breast cancer using artificial neural networks. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Feb;120(1):83-93.
- Lee DF, Hung MC. Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2008 Sep 15;14(18):5656-62.
- Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*. 2007 Jan 18;356(3):217-26.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004 Jun;5(6):607-16.
- Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 20;102(38):13550-5.
- Moiseeva EP, Belkin AM, Spurr NK, Koteliensky VE, Critchley DR. A novel dystrophin/utrophin-associated protein is an enzymatically inactive member of the phosphoglucomutase superfamily. *Eur J Biochem*. 1996 Jan 15;235(1-2):103-13.
- Moiseeva EP, Critchley DR. Characterisation of the promoter which regulates expression of a phosphoglucomutase-related protein, a component of the dystrophin/utrophin cytoskeleton predominantly expressed in smooth muscle. *Eur J Biochem*. 1997 Sep 15;248(3):634-43.
- Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jul;116(2):295-302.
- Morrow PK, Hortobagyi GN. Management of breast cancer in the genome era. *Annu Rev Med*. 2009;60:153-65.
- Nagai MA, Fregnani JH, Netto MM, Brentani MM, Soares FA. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Nov;106(1):49-56.
- Ng WL, Yan D, Zhang X, Mo YY, Wang Y. Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J. *DNA Repair (Amst)*. 2010 Nov 10;9(11):1170-5.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817-26.

- Paik S. Is gene array testing to be considered routine now? *Breast*. 2011 Oct;20 Suppl 3:S87-91.
- Paiva CE, Drigo SA, Rosa FE, Moraes Neto FA, Caldeira JR, Soares FA, et al. Absence of transforming growth factor-beta type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. *Ann Oncol*. 2010 Apr;21(4):734-40.
- Pal R, Srivastava N, Chopra R, Gochhait S, Gupta P, Prakash N, et al. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer*. 2010;9:303.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 5:39-48.
- Pichot CS, Arvanitis C, Hartig SM, Jensen SA, Bechill J, Marzouk S, et al. Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8347-56.
- Pollan M. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Sep;123 Suppl 1:3-6.
- Poortinga G, Wall M, Sanij E, Siwicki K, Ellul J, Brown D, et al. c-MYC coordinately regulates ribosomal gene chromatin remodeling and Pol I availability during granulocyte differentiation. *Nucleic Acids Res*. 2011 Apr;39(8):3267-81.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 2;12(5):R68.
- Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM, Pohlreich P. The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Aug;104(2):121-8.
- Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009 Jan;41(1):40-7.
- Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011 Nov 19;378(9805):1812-23.
- Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet*. 2006 Aug;38(8):873-5.

- Rio PG, Pernin D, Bay JO, Albuissou E, Kwiatkowski F, De Latour M, et al. Loss of heterozygosity of BRCA1, BRCA2 and ATM genes in sporadic invasive ductal breast carcinoma. *Int J Oncol*. 1998 Oct;13(4):849-53.
- Rosa FE, Silveira SM, Silveira CG, Bergamo NA, Neto FA, Domingues MA, et al. Quantitative real-time RT-PCR and chromogenic in situ hybridization: precise methods to detect HER-2 status in breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:90.
- Saal LH, Johansson P, Holm K, Gruvberger-Saal SK, She QB, Maurer M, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7564-9.
- Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2001 Jun 28;344(26):1997-2008.
- Shapiro DM, Fugmann RA. A role for chemotherapy as an adjunct to surgery. *Cancer Res*. 1957 Dec;17(11):1098-101.
- Shi M, Guo N. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2009 Jun;35(4):328-34.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):259-73.
- Song L, Lin C, Wu Z, Gong H, Zeng Y, Wu J, et al. miR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. *PLoS One*. 2011;6(9):e25454.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
- Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Feb 15;98(4):262-72.

- Takahashi S, Moriya T, Ishida T, Shibata H, Sasano H, Ohuchi N, et al. Prediction of breast cancer prognosis by gene expression profile of TP53 status. *Cancer Sci*. 2008 Feb;99(2):324-32.
- Thompson PA, Brewster AM, Kim-Anh D, Baladandayuthapani V, Broom BM, Edgerton ME, et al. Selective genomic copy number imbalances and probability of recurrence in early-stage breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(8):e23543.
- Tommiska J, Bartkova J, Heinonen M, Hautala L, Kilpivaara O, Eerola H, et al. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2008 Apr 10;27(17):2501-6.
- Treilleux I, Chapot B, Goddard S, Pisani P, Angele S, Hall J. The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):63-9.
- Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS, et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:276.
- Tsuji E, Tsuji Y, Fujiwara T, Ogata S, Tsukamoto K, Saku K. Splicing variant of Cdc42 interacting protein-4 disrupts beta-catenin-mediated cell-cell adhesion: expression and function in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 27;339(4):1083-8.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
- Vo QN, Kim WJ, Cvitanovic L, Boudreau DA, Ginzinger DG, Brown KD. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. *Oncogene*. 2004 Dec 16;23(58):9432-7.

- Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9.
- Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(2):489-98.
- Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):263-80.
- West RB, Nuyten DS, Subramanian S, Nielsen TO, Corless CL, Rubin BP, et al. Determination of stromal signatures in breast carcinoma. *PLoS Biol* 2005 Jun;3(6):e187.
- Winter SC, Buffa FM, Silva P, Miller C, Valentine HR, Turley H, et al. Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res* 2007 Apr 1;67(7):3441-9.
- Wo JY, Chen K, Neville BA, Lin NU, Punglia RS. Effect of very small tumor size on cancer-specific mortality in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 1;29(19):2619-27.
- Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J, Zheng W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol*. 2011 May;12(5):477-88.
- Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008 Nov;14(11):2348-60.
- Ye C, Cai Q, Dai Q, Shu XO, Shin A, Gao YT, et al. Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1729-35.
- Yerushalmi R, Hayes MM, Gelmon KA. Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Ann Oncol*. 2009 Nov;20(11):1763-70.
- Yuan R, Fan S, Achary M, Stewart DM, Goldberg ID, Rosen EM. Altered gene expression pattern in cultured human breast cancer cells treated with hepatocyte growth

factor/scatter factor in the setting of DNA damage. Cancer Res. 2001 Nov 1;61(21):8022-31.



Down-regulation of *ATM* gene is associated with worse prognosis in sporadic breast carcinomas.

Renata Camargo Bueno ^{1,2}, Sandra Aparecida Drigo ², Renata de Azevedo Canevari ², Maria Aparecida Custódio Domingues ¹, Francisco Alves Moraes Neto ³, José Roberto Fígaro Caldeira ⁴, Fernando Augusto Soares ⁵, Silvia Regina Rogatto ^{2*}.

¹ Department of Pathology, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

² NeoGene Laboratory, Department of Urology, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil and A. C. Camargo Cancer Treatment and Research Center, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Senology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, São Paulo, Brazil.

⁵ Department of Pathology, A. C. Camargo Cancer Treatment and Research Center, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author:

Silvia Regina Rogatto, PhD

NeoGene Laboratory, Department of Urology, São Paulo State University - UNESP

Distrito de Rubião Junior, Botucatu, SP, Brazil,

CEP: 18618-970

Phone: +55-14-38116436

Fax: +55-14-38116271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br or silvia.rogatto@hcancer.org.br

Supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Running title: *ATM* and prognosis in breast cancer.

Keywords: breast cancer, ataxia-telangiectasia mutated gene (*ATM*), prognostic marker, microRNA.

Manuscrito segundo as normas do Periódico Annals of Oncology (ISSN: 1569-8041) – fator de impacto 6.45

Abstract

Background: *ATM* mutations have been associated with moderate risk to develop familial Breast Cancer (BC). In sporadic BC, a down-regulation of *ATM* is described in a subset of cases. However, prognostic value and regulatory mechanism involved in *ATM* expression are not completely understood.

Patients and methods: Expression of *ATM* gene and miRNAs (miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-664, miR-576-5p and miR-18a) were evaluated by RT-qPCR in BC ($N=52$) and in normal breast samples ($N=5$). *ATM* protein expression was investigated by immunohistochemistry in 926 sporadic BC.

Results: Negative correlation between *ATM* levels and miR-664 ($P=0.035$ and $r=-0.293$), and miR-421 ($P=0.075$ and $r=-0.249$) were observed. Significantly lower *ATM* levels were associated with high grade tumours. Absence of *ATM* protein expression was associated with metastasis ($P<0.001$), with reduced disease-free survival (DFS, $P<0.0001$) and overall survival (OS, $P<0.0001$). Multivariate analyses revealed *ATM* as an independent prognostic marker for DFS and OS ($P<0.001$, $HR=0.535$, and $P<0.001$, $HR=0.534$).

Conclusions: The data suggested *ATM* as a prognostic marker in BC. In addition, the miR-664 and miR-421 are putative candidates to regulate *ATM* expression in a subset of BC.

Introduction

Ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene synthesizes a protein kinase member of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related protein kinase (PIKK) family. ATM is a primary transducer in DNA damage response pathways, mainly activated by double-stranded breaks (DSB). DSB are the most harmful lesion to DNA and, if not repaired, could lead to genomic rearrangements and chromosomal instability contributing to tumorigenesis [1].

Mutations in the *ATM* gene cause Ataxia Telangiectasia (AT), an autosomal recessive neurological disorder characterized by immunodeficiency, cancer predisposition, radiosensitivity, insulin-resistant diabetes and premature aging. In addition to the pivotal role of ATM kinase in DNA damage response, reports from AT patients and ATM-deficient mouse have highlighted its involvement in cell cycle control, apoptosis, gene regulation, oxidative stress and telomere maintenance. As a tumour suppressor gene, *ATM* has been described as involved in several malignancies [2-4], including breast carcinomas.

In 1987, Swift et al. reported at first time that mothers of AT patients presented higher risk of developing BC and other tumours [5]. Subsequently, *ATM* gene was associated with moderate risk to BC in family-based and population-based studies [6]. Although several *ATM* mutations have been described, they are rare and frequently associated with hereditary BC [7].

In sporadic breast carcinomas, ATM transcript and protein down-regulation has been reported [8-10], though the mechanisms involved in *ATM* deregulation are still unknown. Although allelic loss has been proposed as one of the mechanisms for *ATM* gene inactivation, since loss of heterozygosity (LOH) has been reported in a subset of sporadic BC cases [11], the second allele inactivation is still unclear [12]. Epigenetic silencing of *ATM* gene has been proposed, but studies on the methylation status of *ATM* have shown contradictory results. *ATM* hypermethylation was found in 18 out of 33 (78%) locally advanced breast tumours (18 out of 33) [8]. Recent reports have indicated that *ATM* promoter hypermethylation is not a mechanism of *ATM* under-expression in BC [13-15].

Based on the literature data, an alternative mechanism for regulating ATM expression might be involved in BC. Recently, a post-transcriptional regulation of ATM

expression by microRNAs was reported in neuroblastoma cells [16], glioma cell line [17] and breast carcinomas [18]. MicroRNAs are small non-coding RNAs, with about 18-25 nucleotides long, which regulate gene expression through degradation or inhibition of mRNA translation. miRNAs have been associated with several biological processes, such as cell cycle regulation, cellular growth, apoptosis, cell differentiation and stress response. It is well known that deregulation of miRNA expression plays an important role in tumour development and progression by modulating oncogenic or tumour-suppressor pathways [19].

The aim of this study was to assess *ATM* gene and protein expression in sporadic BC and to correlate findings with clinical outcome. Expression of miRNAs predicted to regulate *ATM* was also evaluated and correlated with *ATM* transcript levels.

Patients and methods

Patients

Ductal invasive BC samples ($N=978$) were obtained from Amaral Carvalho Hospital (Jaú, São Paulo, Brazil) and Department of Pathology, AC Camargo Hospital (São Paulo, São Paulo, Brazil).

ATM gene and microRNA expression was evaluated in 52 fresh BC samples from patients submitted to segmental resection or mastectomy. Five histopathologically normal breast tissue samples were obtained from healthy individuals subjected to breast reduction surgery and used as a normal reference. *ATM* protein expression was investigated in 926 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) BC samples arranged in four tissue microarrays (TMA) from an independent cohort of patients from AC Camargo Hospital, SP.

Eligibility criteria included patients with BC without previous personal or family history of cancer. The samples were obtained previously to chemo- and or radiotherapy treatments. Surgery was the primary treatment in 793 patients; 185 out of 978 patients received neoadjuvant chemotherapy and 160 received neoadjuvant radiotherapy; 339 were treated by adjuvant hormonal therapy, 585 by radiotherapy and 404 by chemotherapy. All patients were advised of the procedures and provided written informed consent. The Human Research Ethics Committee of both institutions approved

the study. Patients were followed prospectively with a mean follow-up of 81.9 ± 35.1 months (1-274 months). Supplemental Table 1 summarizes the clinical and histopathological data of the patients.

ATM gene expression by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from macrodissected frozen tumour and normal breast tissues using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies Inc, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

PCR amplification was performed using 1 µg of total RNA treated with DNase I and SuperScript III™ Reverse Transcriptase enzyme (Invitrogen Life Technologies Inc), following the manufacturer's instructions. The qPCR for *ATM* and reference genes were conducted in a total volume of 10 µl containing Power SYBR Green PCR Master Mix, (Applied Biosystems; Foster City, CA), 1 µl cDNA (1:2) and 200 nM of each primer. The reactions were done in duplicates in 96 well plates using StepOne Plus Thermal Cycler equipment (Applied Biosystems). Dissociation curve was included in all experiments to determine PCR product specificity. The most stable reference genes (*HMBS*, *HPRT* and *ACTB*) were determined by geNorm software [20] from a group of six genes (*ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* and *RPLP0*). Primer sequences are provided in Supplemental Table 2. RT-qPCR experiments were carried out under the recommendation of the MIQE guidelines [21]. Gene relative quantification was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [22].

ATM protein expression by immunohistochemistry (IHC)

ATM expression was assessed in 926 FFPE breast cancer samples arranged in four TMA constructed as previously described [23] and one normal breast sample in a conventional slide. Breast tissues were freshly cut (3 µm) and sections were mounted on conventional slides with organosilane (3-aminopropyl triethoxy-silane) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). After endogenous peroxidase blockage, the antigen retrieval was performed by heating treatment in citrate buffer (pH 6.0) in a pressure-cooker (Pascal®; Dako, Carpinteria, California). Immunohistochemical reactions were performed using the monoclonal rabbit antibody anti-ATM, Clone Y170 (Epitomics, Burlingame, CA, USA) (dilution 1:200) followed by incubation with the polymer detection system (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK). Reactions were developed

with a solution containing 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St Louis, MA, USA) and 0.01 H₂O₂. Positive and negative controls were included in all reactions, in accordance with the manufacturer's recommendations. The final scores were considered as negative or positive according to the absence or presence of nuclear staining in epithelial cells. IHC scoring was performed independently by two pathologists (MACD and FAS) and was blinded to the outcome and clinical aspects of each tumour specimen.

MicroRNAs expression by RT-qPCR

Seven microRNAs were selected as candidates for transcriptional regulation of *ATM*: hsa-miR-421, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-203, hsa-miR-664, hsa-miR-576-5p and hsa-miR-18a. MicroRNA selection was based on five algorithms: *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>), *Microcosm* (<http://www.ebi.ac.uk/enright-sry/microcosm>), *PicTar* (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar>), *microRNA.org* (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) and *Diana-microT* (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>). Primer sequences and respective algorithm used are provided in Supplemental Table 3. Three stable microRNAs (RNU48, RNU44 and U47) were selected among six endogenous controls (RNU48, RNU44, U47, RNU6B, let-7a and miR-16), according to geNorm software [20] (Supplemental Table 4).

cDNA synthesis was performed using *Taqman miRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), according to manufacturer's recommendations using the StepOne Plus Thermal Cycler equipment (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests were applied to compare miRNA or *ATM* transcript levels and clinicopathological characteristics. Chi-square or Fisher exact test were used to determine the association between the categorical variables. Spearman test was performed for correlation analyses between *ATM* transcript levels. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) probabilities were calculated using the Kaplan-Meier method. The end-point for OS and DFS analysis was restricted to death due to breast cancer and distant metastasis at diagnosis, respectively. Patients with stage IV

($N=72$), treated with neoadjuvant therapy ($N=170$) and missing follow-up information ($N=47$) were excluded from these analyses. Multivariate analysis was applied using Cox proportional hazards. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and SPSS version 17.0 (SPSS; Chicago, IL) were used for statistical analysis.

Results

ATM expression in breast tumours and association with clinical and histopathological variables

Decreased levels of *ATM* transcript were verified in tumours in comparison with normal samples. However, this difference was not statistically significant ($P=0.064$, median RQ=0.64; Figure 1A).

The comparison between *ATM* transcript levels and the clinical and histopathological parameters showed decreased levels of *ATM* according to increased tumour grade ($P=0.005$, Figure 1B). In addition, lower *ATM* levels were detected in HER2-positive tumours ($P=0.048$, data not shown). No associations between *ATM* gene expression levels and other clinical characteristics were detected.

ATM protein analysis exhibited nuclear immunostaining in normal breast tissues. Representative negative and positive *ATM* tumours are shown in Figure 2A-B. *ATM* protein expression status and clinicopathological parameters analyses are shown in Table 1. An increasing frequency of negative *ATM* tumours was detected according to the tumour grade ($P=0.034$, Table 1), confirming the mRNA findings. In contrast, no association between *ATM* and HER2 expression was detected ($P=0.110$, Table 1). Interestingly, absence of *ATM* protein expression was significantly associated with distant metastasis ($P<0.001$, Table 1).

Survival analysis showed that *ATM* negative tumours were associated with decreased disease-free survival (DFS) in BC patients ($N=637$, $P<0.001$, Table 2, Figure 2C). The predicted 5- and 10-year DFS probabilities for *ATM* positive tumours were 74.4% and 67.9% compared with 59.8% and 48.7% for *ATM* negative tumours, respectively (Table 2). As expected, significant associations were observed between the

established prognostic factors (T, N, clinical stage, tumour grade, ER, PR and HER-2 status) and clinical outcome (Table 2).

ATM status also showed an impact on overall survival (OS). Patients with ATM negative tumours showed a reduced survival compared with their counterparts ($N=637$, $P<0.001$, Table 2, Figure 2D). The established prognostic factors (T, N, clinical stage, tumour grade, ER, PR and HER-2 status) were also significantly associated with OS (Table 2).

Multivariate analyses according to the Cox proportional hazards model showed that ATM protein status is an independent prognostic factor for DFS and OS. ATM positive tumours presented lower risk of developing metastasis compared with ATM negative tumours ($N=637$, $HR=0.535$, $P<0.001$, Table 3). Similarly, ATM positive tumours were associated with lower risk of death due to breast cancer ($N=637$, $HR=0.534$, $P<0.001$, Table 3). Tumour size and involvement of regional lymph nodes were detected as independent prognostic factors for DFS. For OS, the independent prognostic factors detected were tumour grade, tumour size and involvement of regional lymph nodes (Table 3).

miR-664 and miR-421 as putative regulators of ATM expression

Correlation analyses were performed with the transcript levels of seven putative *ATM* regulatory miRNAs (miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664 and miR-18a) and *ATM* mRNA expression.

Negative correlation was found between the expression levels of *ATM* and miR-664 ($r=-0.293$, $P=0.035$, Figure 3A) and miR-421 ($r=-0.249$, $P=0.075$, Figure 3B), although not statistically significant in the latter. No significant correlation was detected between miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-576-5p and miR-18a with *ATM* transcript levels (data not shown).

Discussion

In the present study, although not statistically significant, *ATM* down-regulation was detected in tumours when compared to normal breast samples. This finding is in agreement with other studies [9, 10, 24]. In addition, lower levels of ATM expression

were observed in high grade tumours both in transcript and protein analyses. Ding et al. [25] showed that the combined abnormalities of *ATM*, *BRCA1* and *TP53* genes (DNA double-strand-break checkpoint/repair genes) were associated with poorly differentiated ductal invasive BC. Additionally, ATM aberrant protein expression was also associated with grade II-III tumour in BC [10]. These data suggest that alterations in *ATM* and other genes involved in DNA repair and cell cycle checkpoint may lead to chromosomal instability, consequently being involved in breast carcinogenesis.

Interestingly, a marginally significant under-expression in *ATM* transcript levels was detected in HER2-positive tumours, although no association was detected in protein expression evaluated by IHC. Previous reports found no association between *ATM* mRNA or protein expression and HER-2 status [24, 10]. Nevertheless, a recent report using a murine model of breast cancer suggested that ErbB2-induced aberrant mammary cell proliferation leads to DNA damage response (DDR) mediated by ATM that in turn activates apoptosis and cell senescence [26]. The findings suggested that DDR signalling plays a critical role in blocking tumour transformation in the context of HER-2 altered activation. The authors also speculated if ATM loss could accelerate sporadic mammary tumorigenesis driven by HER2 activation, nonetheless this hypothesis still remains uncertain [26].

The present findings suggests that ATM decreased expression is involved in breast carcinogenesis. Accordingly, absence of ATM protein expression was significantly associated with distant metastasis occurrence in a large and independent cohort of patients, with a long-term follow-up. Furthermore, patients with ATM negative tumours presented shorter DFS and OS. Intriguingly, none association between *ATM* mRNA levels and metastasis was detected. One possible explanation is the small number of patients with metastasis ($N=11$) evaluated by mRNA expression compared with protein expression analysis ($N=371$). Other possibilities included post-transcriptional *ATM* gene regulation, since higher frequency of negative ATM tumours (61% of tumours) in IHC analysis was detected in comparison with ATM gene down-expression (38% of tumours) by RT-qPCR. Overall, the findings suggests that the loss of ATM expression is involved in tumour progression and invasion leading to more aggressive tumour behaviour and worse outcome in BC patients.

The multivariate analyses revealed that ATM protein status is an independent prognostic maker for both DFS and OS. ATM positive expression cases showed lower

risk of metastasis ($P < 0.001$, $HR = 0.535$, $CI_{95\%} = 0.386 - 0.743$) and death due to breast cancer ($P < 0.001$, $HR = 0.534$, $CI_{95\%} = 0.376 - 0.758$). These data suggest that *ATM* is an independent prognostic factor, together with tumour size and regional lymph nodes involvement, which so far are the most reliable prognostic factors in breast tumours [27]. Ye and colleagues [9] evaluated *ATM* mRNA levels in breast tumour samples ($N = 471$) and showed that lower levels of *ATM* transcript were associated with worse outcome (DFS and OS). However, the authors did not demonstrate that *ATM* gene expression is as an independent prognostic marker in BC. Therefore, to our knowledge, this is the first study reporting the prognostic value of ATM in breast carcinomas in a large series of cases with a long-term follow-up.

The mechanisms involved in ATM deregulation in sporadic BC have so far not been clarified. Recent studies have been reported that *ATM* gene expression can be also regulated by miRNAs. From the seven microRNAs selected by *in silico* analysis as putative regulators of ATM expression, only miR-664 showed a significant negative correlation with ATM transcript levels. Although the miR-421 expression showed a negative correlation, it was not statistically significant.

The first study to describe the involvement of miRNA in ATM expression was conducted by Hu et al. [16]. The authors showed that miR-421 suppresses *ATM* expression by targeting the 3'-untranslated region (3'UTR) of *ATM* transcripts in HeLa cell line and in neuroblastoma cell lines (LA-N-1 and LA-N-5). The second report [17] described the over-expression of miR-100 associated with low expression of ATM in human glioma cell lines. It was also demonstrated that miR-100 up-regulation in M059K glioma cells diminishes ATM expression and sensitizes these cells to ionizing radiation. The transcript levels of miR-100 were not assessed in the present study; therefore, it cannot be excluded as a potential regulator of *ATM* expression in BC. Recently, Song et al. [18] evaluated the miR-18a as a putative ATM regulatory miRNA in breast cancer. The authors showed an up-regulation of miR-18a when compared 9 tumour cell lines with one normal breast epithelial cell lineage and also 10 breast tumour tissues with paired adjacent normal breast tissue samples. In addition, ATM protein down-expression was observed when breast cancer cell lines (MDA-MB-231, SKBR3 and 293-T) were transfected with miR-18a. Conversely, ATM up-regulation was detected in these cells after miR-18a suppression. Here, miR-18a showed a negative correlation with *ATM* transcript levels, although it was not significant. The apparent discordant results

between the previous report in breast carcinoma [18] and our study can be explained by differences in the experimental design including the sample size and normal controls, and the evaluation of only one reference microRNA (U6) in the former. Furthermore, it is possible that different events isolated or in cooperation, coordinate the regulation of *ATM*, including other miRNAs, association between different miRNAs and promoter hypermethylation.

Taken altogether, the present study demonstrated a decreased *ATM* expression associated with worse prognosis in ductal invasive breast carcinomas. Since the expression of *ATM* protein proves to be an independent prognostic marker in breast cancer, we suggested its analysis in a large independent cohort study aiming to include this marker in clinical practice. Although other mechanisms may be involved in *ATM* regulation, the results presented here suggest the involvement of miRNA in *ATM* regulation in sporadic breast tumours.

Acknowledgements

This study was supported by Grants from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors would like to thank Dr. Robson Francisco Carvalho for the miRNA *in silico* analysis.

References

1. Bensimon A, Aebersold R, Shiloh Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett* 2011; 585: 1625-1639.
2. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 759-769.
3. Morris LG, Veeriah S, Chan TA. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease. *Oncogene* 2010; 29: 3453-3464.
4. Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA et al. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 2977-3006.
5. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1987; 316: 1289-1294.
6. Fanale D, Amodeo V, Corsini LR et al. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene* 2011;
7. Goldgar DE, Healey S, Dowty JG et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R73.
8. Vo QN, Kim WJ, Cvitanovic L et al. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. *Oncogene* 2004; 23: 9432-9437.
9. Ye C, Cai Q, Dai Q et al. Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Cancer* 2007; 109: 1729-1735.
10. Tommiska J, Bartkova J, Heinonen M et al. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2501-2506.
11. Meng ZH, Ben Y, Li Z et al. Aberrations of breast cancer susceptibility genes occur early in sporadic breast tumors and in acquisition of breast epithelial immortalization. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 214-222.
12. Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM, Pohlreich P. The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 104: 121-128.
13. Brandes JC, Carraway H, Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene* 2007; 26: 6229-6237.

14. Treilleux I, Chapot B, Goddard S et al. The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Histopathology* 2007; 51: 63-69.
15. Pal R, Srivastava N, Chopra R et al. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer* 2010; 9: 303.
16. Hu H, Du L, Nagabayashi G et al. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 1506-1511.
17. Ng WL, Yan D, Zhang X et al. Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9: 1170-1175.
18. Song L, Lin C, Wu Z et al. miR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. *PLoS One* 2011; 6: e25454.
19. Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med* 2010; 16: 257-267.
20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.
21. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-622.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
23. Nagai MA, Fregnani JH, Netto MM et al. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106: 49-56.
24. Salimi M, Mozdarani H, Majidzadeh K. Expression pattern of ATM and cyclin D1 in ductal carcinoma, normal adjacent and normal breast tissues of Iranian breast cancer patients. *Med Oncol* 2011;

25. Ding SL, Sheu LF, Yu JC et al. Abnormality of the DNA double-strand-break checkpoint/repair genes, ATM, BRCA1 and TP53, in breast cancer is related to tumour grade. *Br J Cancer* 2004; 90: 1995-2001.
26. Reddy JP, Peddibhotla S, Bu W et al. Defining the ATM-mediated barrier to tumorigenesis in somatic mammary cells following ErbB2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 3728-3733.
27. Frohlich H. Network based consensus gene signatures for biomarker discovery in breast cancer. *PLoS One* 2011; 6: e25364.

Table 1. ATM protein expression detected by immunohistochemistry (IHC) in breast tumour samples according to the clinical and histopathological variables ($N=926$).

Variables	N	ATM		P
		N (%)		
		Negative	Positive	
Age (years)				0.488
<50	356	211 (59)	145 (41)	
≥50	565	349 (62)	216 (38)	
NA	5			
T				0.238
T1	82	47 (57)	35 (43)	
T2	387	233 (60)	154 (40)	
T3	124	86 (69)	38 (31)	
T4	288	174 (60)	114 (40)	
NA	45			
N				0.328
N0	291	166 (57)	125 (43)	
N1	256	159 (62)	97 (38)	
N2	216	133 (62)	83 (38)	
N3	135	89 (66)	46 (34)	
NA	28			
M				1.000
Negative	830	506 (61)	324 (39)	
Positive	72	44 (61)	28 (39)	
NA	24			

<i>Tumour grade</i>				0.034
G1	130	66 (51)	64 (49)	
G2	522	328 (63)	194 (37)	
G3	268	168 (63)	100 (37)	
NA	6			
<i>ER</i>				0.825
Negative	286	176 (62)	110 (38)	
Positive	585	355 (61)	230 (39)	
NA	55			
<i>PR</i>				0.180
Negative	457	286 (63)	171 (37)	
Positive	386	224 (58)	162 (42)	
NA	83			
<i>HER2</i>				0.110
Negative	667	411 (62)	256 (38)	
Positive	107	57 (53)	50 (47)	
NA	152			
<i>Distant metastasis*</i>				<0.001
Negative	444	241 (54)	203 (46)	
Positive	371	257 (69)	114 (31)	

T: Tumour size; N: lymph nodes involvement; M: Metastasis at diagnosis; ER: oestrogen receptor alpha, PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; NA: information not available; significant data are indicated in bold;

*: patients with metastasis at diagnosis were excluded in this analysis.

Table 2. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) analyses of breast cancer patients (N=637).

Variable	N	DFS		P-value	OS		P-value
		5 years (%)	10 years (%)		5 years (%)	10 years (%)	
ATM				<0.001			<0.001
Negative	391	59.8	48.7		72.4	56.0	
Positive	246	74.4	67.9		80.6	71.2	
Age (years)				0.079			0.336
<50	231	61.7	52.5		73.4	58.8	
≥50	405	67.5	58.3		76.8	63.9	
Stage (TNM)				<0.001			<0.001
I	48	84.5	82.0		93.1	90.3	
II	320	80.8	70.5		88.4	77.9	
III	269	43.9	34.8		57.5	38.8	
T				<0.001			<0.001
T1	77	85.3	82.4		91.8	87.0	
T2	341	75.0	64.6		83.3	71.9	
T3	94	53.9	40.6		68.6	47.2	
T4	112	32.2	26.0		46.8	30.2	

Chemotherapy					0.474				0.431
No	279	67.7	57.1			78.2		63.9	
Yes	337	65.0	56.7			73.8		61.4	
Radiation Therapy					0.857				0.842
No	105	65.3	60.7			72.7		63.5	
Yes	510	66.5	56.4			76.5		62.5	
Hormone Therapy					0.488				0.637
No	337	65.3	56.7			71.9		61.8	
Yes	278	67.4	57.3			80.5		63.4	

P-value obtained by *Log rank* test. Significant data are indicated in bold.

Table 3. Multivariate model for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) analysis in breast cancer patients ($N=637$).

Variable	<i>P</i>	HR (95% CI)
DFS		
ATM (positive vs negative)	<0.001	0.535 (0.386-0.743)
T (T4 vs T3 vs T2 vs T1)	<0.001	1.666 (1.404-1.977)
N (N3 vs N2 vs N1)	<0.001	1.534 (1.332-1.767)
OS		
ATM (positive vs negative)	<0.001	0.534 (0.376-0.758)
Tumour Grade (G3 vs G2 vs G1)	0.010	1.387 (1.081-1.781)
T (T4 vs T3 vs T2 vs T1)	<0.001	1.660 (1.391-1.982)
N (N3 vs N2 vs N1)	<0.001	1.634 (1.406-1.899)

vs: versus; HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval; *P*-value obtained by Log rank test. Significant data are indicated in bold.

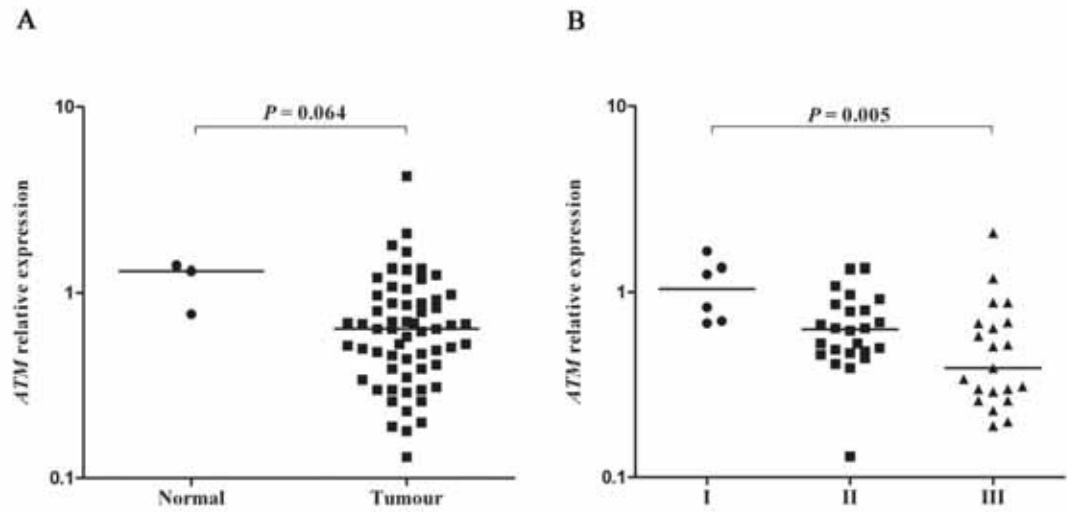


Figure 1. (A) Relative expression of *ATM* mRNA in breast tumour samples and in normal breast tissues. **(B)** *ATM* mRNA relative expression according to the tumour grade. The transcript expression values are shown in log scale and the bars indicate the median value in each group.

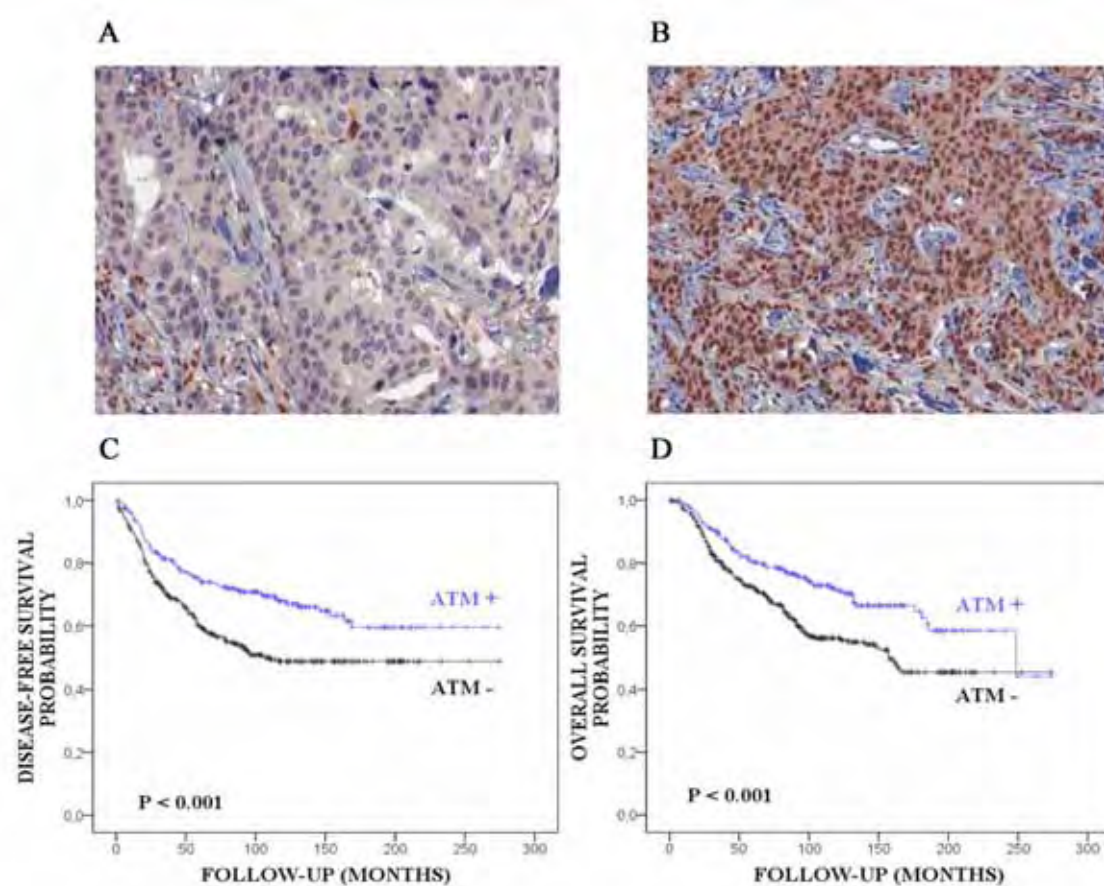


Figure 2. Immunohistochemical analysis for ATM. Negative **(A)** and positive **(B)** ATM immunostaining in breast tumour cells. Disease-free survival **(C)** and overall survival **(D)** curves according to ATM protein expression in breast cancer patients. P -values were determined by *Log-rank* test.

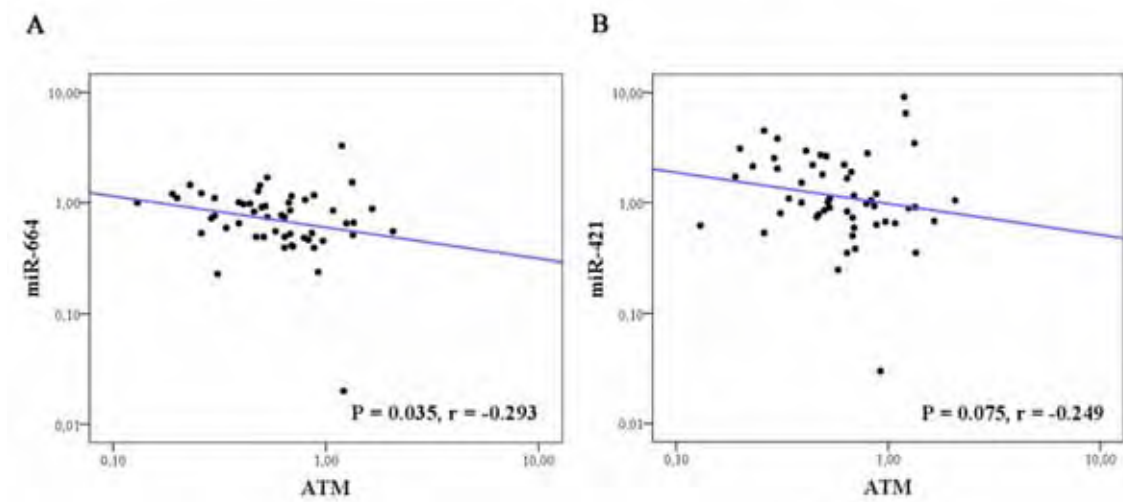


Figure 3. Correlation of *ATM* transcript levels with miR-664 (A) and miR-421 (B) relative expression. *P*-values and correlation coefficient (*r*) values were determined by Spearman test.

Supplemental Table 1. Clinical and histopathological features of breast cancer patients.

Variables	IHC (N=926)	RT-qPCR (N=52)
<i>Age (years)</i>		
Median (range)	54 (24-93)	59 (30-94)
<50	356 (38)	20 (38)
≥50	564 (61)	32 (62)
NA	6 (1)	0
<i>Tumour grade</i>		
G1	130 (14)	6 (12)
G2	522 (56)	24 (46)
G3	268 (29)	21 (40)
NA	6 (1)	1 (2)
<i>Nodal Status</i>		
Negative	291 (31)	15 (29)
Positive	607 (66)	36 (69)
NA	28 (3)	1 (2)
<i>Stage</i>		
I	51 (6)	5 (10)
II	356 (38)	28 (53)
III	428 (46)	18 (35)
IV	72 (8)	1 (2)
NA	19 (2)	0
<i>Receptors status (IHC)</i>		
ER		
Negative	286 (31)	15 (29)
Positive	585 (63)	36 (69)
NA	55 (6)	1 (2)
PR		
Negative	457 (49)	23 (44)
Positive	386 (42)	28 (54)
NA	83 (9)	1 (2)
HER2		
Negative	667 (72)	39 (75)
Positive	107 (12)	7 (13)
NA	152 (16)	6 (12)

IHC: immunohistochemistry; ER: oestrogen receptor alpha; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; NA: not available.

Supplemental Table 2. Primer sequences for gene expression analysis.

Genes	Sequences	Chromosomal Location
<i>ATM</i>	F: 5'-TTTAGAAATTCTTTCCAAAAGCCCTG-3' R: 5'-TTATTTGTTTCAGCTGCTTGCTCA-3'	11q22-q23
<i>HMBS*</i>	F: 5'-GGCAATGCGGCTGCAA-3' R: 5'-GGGTACCCACGCGAATCAC-3'	11q23.3
<i>HPRT1*</i>	F: 5'-TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG-3' R: 5'-GGCCTCCCATCTCCTTCATC-3'	Xq26.1
<i>ACTB*</i>	F: 5'-TTCCTGGGCATGGAGTC-3' R: 5'-CAGGTCTTTGCGGATGTC-3'	7p22
<i>RPLP0*</i>	F: 5'- GGAGACGCATTACACCTTC-3' R: 5'- CTTCACCTTAGCTGGGG-3'	12q24.2
<i>GUSB*</i>	F: 5'- GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT-3' R: 5'- CCGAGTGAAGATCCCCCTTTTA-3'	7q21.11
<i>GAPDH*</i>	F: 5'- TGCACCACCAACTGCTTAG-3' R: 5'- GATGCAGGGATGATGTTC-3'	12p13

* Reference genes; F= forward sequence; R = reverse sequence

Supplemental Table 3. MicroRNAs sequences and the algorithm used

Algorithm	MicroRNA	miRNA sequence	Stem Loop sequence	Website
Microcosm Targets	1. hsa-miR-421	AUCAACAGACAUUAAUUGGGCGC	GCACAUUGUAGGCCUCUAUAAAUGUUU	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm
			GUUGAAUGAAAAAU GAAUCAUCAACA	
			GACAUUAAUUGGGCGCCUGCUCUGUGA UCUC	
PicTar	2. hsa-miR-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGA	http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar
			UAGGUUGUGUGCUGUCCAGCCUGUUCU CCAUUACUUGGCUCGGGGACCGG	
Target Scan	3. hsa-miR-203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	GUGUUGGGGACUCGCGCGGUGGGUCCAG	http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan
			UGGUUCUUAAACAGUUCAACAGUUCUGU	
			AGCGCAAUUGUGAAAUGUUUAGGACCA	
			CUAGACCCGGCGGGCGCGGCACAGCGA	
Target Scan	4. hsa-miR-18a	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	UGUUCUAAGGUGCAUCUAGUCAGAUUA	http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan
			GUGAAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCU AAGUGCUCUUCUGGCA	

Algorithm	MicroRNA	miRNA sequence	Stem Loop sequence	Website
MicroRNA.org	5. hsa-miR-664	UAUUCAUUUUAUCCCCAGCCUACA	GAACAUUGAAAAACUGGCUAGGGAAAAUG	http://www.microrna.org/microrna/home.do
			AUUGGAUAGAAACU AUU AUUCUAUUCA	
			UUUAUCCCCCAGCCUACAAAAAUGAAAAA A	
MicroRNA.org	6. hsa-miR-576-5p	AUUCUAAUUUUCUCCACGUCUUU	UACAAUCCAACGAGGAUUCUAAUUUCU	http://www.microrna.org/microrna/home.do
			CCACGUCUUUGGUAAUAAAGGUUUGGCA	
			AAGAUGUGGAAAAAUUGGAAUCCUCAU UCGAUUGGUUAUAACCA	
Diana-microT	7. hsa-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	GUGGCCUCGUUCAAGUAUCCAGGAUA	http://diana.cs.lab.ece.ntua.gr/microT/
			GGCUGUGCAGGUCCCAAUGGGCCUAUUC	
			UUUGGUUACUUGCACGGGGGACGC	

Supplemental Table 4. Sequences of reference microRNAs tested.

MicroRNAs	Mature microRNA sequence	Stem Loop ID
RNU48	GATGACCCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTCGCT GATGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC	568908
RNU44	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAAC ATGAAGGTCTTAATTAGCTCTAACTGACT	568907
U47	TAATGATTCTGCCAAATGAAATATAATGATATCA CTGTAAAACCGTTCCATTTTGATTCTGAGGT	664259
RNU6B	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGT GAAGCGTTCATATTTTT	568915
Let-7-a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	hsa-let-7a-1
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	hsa-mir-16-1

CONCLUSÃO

- Os genes *IKBKB*, *POLR1B*, *PGM5* e *ATM*, apresentaram níveis de expressão diminuída e *TRIP10* aumentada, embora não significativo, nos carcinomas mamários em comparação com os tecidos normais, sugerindo que estes genes podem ter um papel importante na carcinogênese mamária.
- Quando correlacionados às características clínicas e histopatológicas das pacientes, os genes *IKBKB*, *POLR1B* e *PGM5* apresentaram expressão aumentada nos tumores ER-positivos. Os genes *IKBKB*, *TRIP10* e *PGM5* apresentaram níveis reduzidos de sua expressão nos tumores HER2-positivos. Os transcritos *PGM5* e *ATM* apresentaram diminuição significativa dos níveis de expressão em tumores de alto grau.
- Entre os sete microRNAs selecionados como potenciais reguladores do gene *ATM* (miR-26a, miR-26b, miR-203, miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a), apenas o miR-664 apresentou uma correlação negativa significativa com os transcritos do *ATM*. O miR-421 também apresentou uma correlação negativa, embora estatisticamente não significativa.
- Foi detectada expressão diminuída dos miR-26a e miR-26b e aumentada do miR-18a entre as amostras tumorais na comparação com os controles normais. Estes dados sugerem o envolvimento destes miRNAs na carcinogênese mamária.
- Quando correlacionados às características clínicas e histopatológicas das pacientes, foi verificado aumento dos níveis dos miR-26a e miR-26b e diminuição do miR-18a em tumores ER-positivos. A diminuição dos níveis dos microRNAs miR-421, miR-576-5p, miR-664 e miR-18a foi observada nos tumores PR-positivos. Nos tumores HER2 positivos, foi detectado o aumento dos níveis dos

miR-203 e o miR-18a. Foi verificada a diminuição dos níveis dos miR-26a e miR-26b e aumento do miR-18a conforme aumentava o grau tumoral. Estes achados precisam ser detalhadamente investigados para a comparação com os genes que estes miRNAs regulam e seu papel funcional na carcinogênese mamária.

- A diminuição da expressão da proteína ATM foi significativamente associada aos tumores de alto grau e ao desenvolvimento de metástase à distância. A análise multivariada mostrou que o ATM é um marcador prognóstico independente para sobrevida livre de doença e sobrevida global. Os tumores que expressavam a proteína ATM apresentam um menor risco de desenvolvimento de metástase à distância e de morte pela doença. Estes resultados sugerem que o ATM é um novo marcador prognóstico em carcinomas mamários, confirmando os dados obtidos nos *arrays* de expressão.



Anexo



Botucatu, 04 de Abril de 2011.

Of. 114/11-CEP

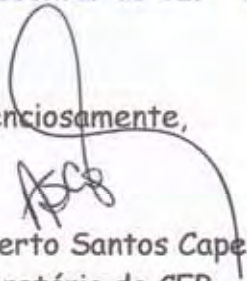
Ilustríssima Senhora
Prof^a. Titular Silvia Regina Rogatto
Departamento de Urologia
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof^a. Silvia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 3816-2011**) "**Valor prognóstico e preditivo de genes candidatos selecionados após análise de oligoarray em carcinomas mamários**", a ser conduzido por Renata Camargo Bueno, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pela Prof^a Sandra Drigo Linde, com a colaboração de Fernando Augusto Soares, José Roberto Fígaro Caldeira, Maria Aparecida Custódio Domingues e Robson Francisco Carvalho, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 04 de abril de 2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.